

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin

Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

**Der Einfluß von rRNA und tRNA auf die Translation
von Globin mRNA in zellfreien Proteinbiosynthese-
Systemen**

DISSERTATION

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Christian Finke
aus Salzgitter · Lebenstedt

1977

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie
der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

**Der Einfluß von rRNA und tRNA auf die Translation
von Globin mRNA in zellfreien Proteinbiosynthese-
Systemen**

DISSERTATION

zur

Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Zahnarzt Christian Finke
aus Salzgitter - Lebenstedt

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann

Korreferent: Prof. Dr. Dr. H. Kröger

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Zahn-,
Mund- und Kieferheilkunde der Freien Universität
Berlin



Promoviert am: 8.11.1977

MEINEM SOHN FLORIAN

Im Text gebrauchte Abkürzungen

DNA	Desoxyribonucleinsäure
RNA	Ribonucleinsäure
HnRNA	(heterogeneous nuclear RNA) heterogene Kern RNA
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale-Ribonucleinsäure
tRNA	transfer-Ribonucleinsäure
mRNP	messenger-Ribonucleoproteinkomplex
SDS	(sodium dodecyl sulfate) Natriumdodecyl- sulfat
S	Sedimentationskonstante in Svedbergein- heiten (S) (S) = 10^{-13} sec
rpm	(rotations per minute) Umdrehungen pro Minute
cpm	(counts per minute) Impulse pro Minute
dpm	(desintegrations per minute) Zerfälle pro Minute
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
HEPES	N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfon- säure
2-ME	2-Mercaptoäthanol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
PPO	2.5-Diphenyloxazol
POPOP	1.4 bis 2 (-4-Methyl-5-phenyloxazolyl)- Benzol
TCA	(trichloroacetic acid) Trichloressigsäure

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	6
2. <u>Ziel der Arbeit</u>	9
3. <u>Methoden und Material</u>	10
3.1. Isolierung von Globin mRNA	10
3.1.1. Isolierung unreifer roter Blutzellen aus Hühnern	10
3.1.2. Präparation des postmitochondrialen Überstandes und der Polysomen	10
3.1.3. Isolierung von 9 S RNA	11
3.1.4. Auftrennung der 9 S RNA durch oligo- (dT)-Cellulose nach Gehalt an poly(A)	13
3.2. Isolierung von tRNA und rRNA	13
3.2.1. Präparation von tRNA (4 S) und rRNA (5 S, 18 S und 28 S) aus Hühnerem- bryonen	13
3.2.2. Präparation von tRNA und rRNA aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern	15
3.3. Radioaktive Markierung von 9 S mRNA mit ^{125}J	15
3.4. Isolierung ribosomaler Waschfraktionen (RWF) aus Hühnererythroblasten	16
3.5. Präparation von zellfreien Protein- biosynthese-Systemen	16
3.5.1. Präparation eines zellfreien Systems aus Ehrlich Aszites-Zellen	16
3.5.2. Präparation eines zellfreien Systems aus Weizenkeimen	18

	Seite
3.6. Zellfreie Proteinbiosynthese	18
3.6.1. Translation im Aszites-System	18
3.6.2. Translation im Weizenkeim System	19
3.6.3. Inkubation von ^{125}J markierter RNA	20
3.7. Produktanalyse	21
3.7.1. Sephadex G 100 Gelfiltration	21
3.7.2. Carboxymethylcellulose-Chromatographie	21
3.8. Radioaktivitätsmessung	22
3.8.1. Radioaktivitätsmessung von TCA-ge- fälltem Material	22
3.8.2. Radioaktivitätsmessung von Material in wäßriger Lösung	22
3.9. Puffer	23
3.10. Chemikalien	24
4. <u>Ergebnisse</u>	26
4.1. Isolierung von 9 S mRNA, 5 S, 18 S und 28 S rRNA sowie von 4 S tRNA	26
4.1.1. Isolierung von Globin mRNA	26
4.1.2. Isolierung von 5 S, 18 S und 28 S rRNA sowie von 4 S tRNA	29
4.2. Jodierung der mRNA mit ^{125}J	31
4.3. Präparation der zellfreien Systeme und von ribosomalen Waschfraktionen (RWF)	32
4.3.1. Aszites-System	32
4.3.2. Weizenkeim-System	32
4.3.3. Ribosomale Waschfraktionen (RWF)	33
4.4. Translation der Globin mRNA im Aszites- System in Abwesenheit und Gegenwart von 4 S, 5 S, 18 S und 28 S RNA	33
4.4.1. Translation in Gegenwart von RWF	33
4.4.2. Translation in Abwesenheit von RWF	36

	Seite
4.4.3. Translation im Aszites-System bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten	38
4.5. Translation der Globin mRNA im Weizenkeim-System in Abwesenheit und Gegenwart von 4 S, 5 S, 18 S und 28 S RNA	40
4.5.1. Translation in Abwesenheit von RWF	41
4.5.2. Translation in Gegenwart von RWF	43
4.6. Produktanalyse der Translationsansätze des Aszites-Systems	43
4.7. Untersuchung der Degradation von ^{125}J Globin mRNA in zellfreien Systemen	48
4.7.1. Aszites-System	48
4.7.2. Weizenkeim-System	50
5. <u>Diskussion</u>	52
6. <u>Zusammenfassung</u>	59
7. <u>Literaturverzeichnis</u>	60

1. Einleitung

Die genetische Information jeder Zelle wird nach dem zentralen Dogma der Proteinbiosynthese in folgender Weise zum Ausdruck gebracht:



Eine Erweiterung um den Schritt der Synthese von HnRNA mit anschließendem Processing zu mRNA erscheint ent-

gegen der ursprünglichen Formulierung als notwendig, da in letzter Zeit die Existenz von Precursor-Molekülen in der HnRNA für definierte mRNA-Spezies sehr wahrscheinlich gemacht worden ist (Ross¹, Curtis und Weissmann², Kwan et al.³, Bastos und Aviv⁴, Knöchel und Grundmann⁵).

Die Untersuchung der Translation in Eukaryonten-Systemen hat in den letzten Jahren durch die Isolierung zahlreicher definierter mRNA-Spezies große Fortschritte gemacht (siehe zusammenfassende Darstellung von Mathews⁶). Als *conditio sine qua non* für den Nachweis solcher Isolierungen gilt die Translation in einem zellfreien System *in vitro* oder mit Hilfe von Injektionstechniken *in vivo* mit anschließender Produktanalyse auf die neu-synthetisierten Proteine. Sehr häufig benutzte zellfreie Systeme werden aus Reticulozyten, Aszites-Zellen und Weizenkeimen hergestellt. Darüber hinaus wurde versucht, die Menge einer spezifischen mRNA durch das Ausmaß der Synthese des entsprechenden Proteins im zellfreien System abzuschätzen (Schutz et al.⁷, Sippel et al.⁸). Diese Berechnungen sind aber nur dann gültig, wenn die Proteinsynthese nicht durch andere Substanzen beeinflusst wird, welche mit der mRNA zusammen in das System gegeben werden, oder wenn die mRNA-Präparationen hoch gereinigt sind. Solche begleitenden Substanzen stellen in erster Linie die ribosomalen RNA-Spezies dar, die häufig nur sehr schwer von mRNA abgetrennt werden können (Kabat⁹). Für den Fall der zellfreien Synthese im Aszites-System wurde berichtet, daß die Gegenwart größerer Mengen von *E. coli* 16 S rRNA oder Kaninchen-reticulozyten 18 S rRNA die Translation von Globin- und Histon mRNA weiter stimuliert (Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰). Dieser Effekt soll möglicherweise durch

einen Schutz der mRNA gegenüber einem Abbau durch RNAasen verursacht werden. Andererseits wurde die Potenzierung durch rRNA in einem mRNA-abhängigen zellfreien System aus Kaninchenreticulozyten durch eine spezifische Funktion der rRNA erklärt, nämlich durch Stimulierung der Initiation auf Grund von Basenpaarungen zwischen der mRNA und der 18 S rRNA aus der kleinen ribosomalen Untereinheit (40 S) (Kabat⁹). Diese Erklärung stünde in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus dem procaryotischen E. coli System, wo eine Komplementarität der Nucleotidsequenzen in der 3' Region der 16 S rRNA und der 5' Region von bakteriellen mRNA-Spezies tatsächlich nachgewiesen werden konnte (Shine und Dalgarno¹¹).

2. Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluß von 4 S tRNA, 5 S, 18 S und 28 S rRNA auf die Translation von Globin mRNA in zellfreien Systemen untersucht werden. Durch den Vergleich von zwei verschiedenen Systemen, nämlich dem aus Ehrlich Aszites-Zellen und dem aus Weizenkeimen, soll geklärt werden, ob eine Steigerung der Proteinsynthese in beiden Systemen oder nur einem System nachzuweisen ist. Insbesondere ist die RNAase Aktivität beider Systeme zu untersuchen, um eventuelle Schutzeffekte der oben genannten RNA-Spezies gegenüber der Degradation von mRNA abzuleiten. Der Abbau von mRNA soll durch Verwendung von ^{125}J markierter mRNA untersucht werden.

3. Methoden und Material

3.1. Isolierung von Globin mRNA (Knöchel et al.¹²⁾

3.1.1. Isolierung unreifer roter Blutzellen aus Hühnern

Circa ein Jahr alte weiße Leghorn Hennen (Gewicht 1 - 1,5 kg) wurden durch subcutan injizierte Phenylhydrazin-Lösung an 4 aufeinanderfolgenden Tagen anämisch gemacht. Die Phenylhydrazin-Lösung hatte einen pH Wert von 7,5 und war 2,5 %ig (Schall und Turba¹³). Die Injektionsmenge pro Tag betrug 0,4 ml/kg. 2 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit Äther narkotisiert, und anschließend wurde die vena jugularis freipräpariert. Nach Injektion von 1 ml einer Heparin-Lösung (10 mg/ml) wurde die Vene durchtrennt. Das herauslaufende Blut wurde in einem gekühlten Erlenmeyer-Kolben aufgefangen, der mit 1/10 Volumen 5 %iger Na-Citrat-Lösung (bezogen auf ein zu erwartendes Blutvolumen von 60 ml) gefüllt war. Alle folgenden Arbeiten wurden im Eisbad bzw. bei einer Temperatur unter 4° C durchgeführt.

Durch Zentrifugation (2 000 rpm, Christ Kühlzentrifuge) wurden das Plasma und die weißen Blutzellen von den roten Blutzellen getrennt und anschließend mittels Wasserstrahlpumpenvakuum abgezogen. Die roten Blutzellen wurden dreimal im jeweils dreifachen Volumen Puffer 1 gewaschen und zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen.

3.1.2. Präparation des postmitochondrialen Überstandes und der Polysomen

Die auf diese Weise gereinigten roten Blutzellen

werden mit fünffacher Menge Puffer 2 versetzt und zur Lysis 5 Minuten leicht gerührt. Dann erfolgte eine Homogenisierung durch 5 Strokes im locker eingepaßten Dounce-Homogenisator.

Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 3 (bezogen auf Puffer 2) wurde das Lysat in einem Spinco Al 30 Rotor bei 10 000 rpm und 0° C für 15 Minuten zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Kerne zu entfernen. Das Sediment wurde verworfen. Zur Isolierung der Polysomen wurde der sogenannte postmitochondriale Überstand im Spinco Ti 60 Rotor bei 50 000 rpm und 0° C für 90 Minuten zentrifugiert. Vor der Zentrifugation wurde mit je 1 ml 0,8 M Saccharose in Puffer 4 unterschichtet, um die später sedimentierenden Polysomen weitgehend frei von Verunreinigungen zu erhalten. Der Überstand wurde nach dieser Zentrifugation verworfen und die Sedimente bei -30° C aufbewahrt.

3.1.3. Isolierung von 9 S RNA

Die Polysomen wurden in Puffer 5 aufgenommen (circa 300 mg/10 ml) und durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 0,03 M) dissoziiert. Diese Lösung wurde bei 3 000 rpm und 0° C in einen Spinco Ti 14 Zonal Rotor eingebracht, in dem vorher ein 7-32 %iger (Gewicht/Volumen) Saccharose-Gradient in Puffer 5 aufgebaut worden war. Nach Beschickung wurde das Material bei 32 000 rpm und 0° C für 24 Stunden zentrifugiert. Der Gradient wurde mittels einer Desaga-Schlauchpumpe durch 40 %ige wäßrige Saccharoselösung eluiert, die von peripher in den bei 3 000 rpm und 0° C laufenden Rotor Ti 14 eingepumpt wurde. Das Eluat wurde von Hand fraktioniert (circa 10 ml/Fraktion), und die Extinktion der einzelnen Frak-

tionen wurde bei 254 nm in einem Bausch & Lomb Spektralphotometer gemessen.

Die Fraktionen, die den mRNP-Komplex enthielten, wurden vereinigt. Nach Zugabe von SDS (Endkonzentration 1 %) und NaCl (Endkonzentration 2 %) wurde das Material mit 2 Volumen 96 % Äthanol über Nacht gefällt. Das Präzipitat wurde in einer Christ Kühlzentrifuge bei 5 000 rpm und 0°C für 20 Minuten zentrifugiert und das Pellet im Vakuum der Ölpumpe getrocknet. Nach Lösen in Puffer 5 (circa 1 mg/ml) und Zugabe von 0,1 % SDS wurde das Material auf einen 15 - 30 %igen (Gewicht/Volumen) Saccharose-Gradienten in Puffer 5 aufgebracht. Zentrifugiert wurde im Spinco SW 27 Rotor bei 27 000 rpm und 0°C für 45 Stunden. Der Gradient wurde mit einem Beckman Recovery System eluiert, und die Extinktion bei 254 nm wurde kontinuierlich mit einem LKB Uvicord II gemessen, an das ein Beckman 10" Schreiber mit integriertem TE Wandler angeschlossen war. Das Eluat wurde mit einem LKB Ultro Rac 7 000 fraktioniert (2 ml/Fraktion). Die Fraktionen, die das bei 9 - 10 S sedimentierende Material enthielten, wurden vereinigt. Um noch vorhandene an die RNA gebundene Proteine zu beseitigen, wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50 : 50 : 1) Extraktion vorgenommen (Aviv und Leder¹⁴). Aus der wäßrigen Phase wurde die RNA mit 2 % NaCl und 2 Volumen 96 %igem Alkohol gefällt. Das Material wurde zweimal mit 66 %igem Äthanol, 0,5 % NaCl und anschließend einmal mit 66 % Äthanol, 0,5 % NaCl/Äther (2 : 1) gewaschen. Das Pellet wurde im Vakuum der Ölpumpe getrocknet und die RNA mit destilliertem Wasser so aufgenommen, daß eine Endkonzentration von 1 µg/µl erreicht wurde.

3.1.4. Auftrennung der 9 S RNA durch oligo(dT)-Cellulose nach Gehalt an poly(A)

Die Auftrennung der 9 S RNA nach poly(A)-Gehalt erfolgte durch Hybridisierung an oligo(dT)-Cellulose in Anlehnung an Aviv und Leder¹⁴.

Circa 900 μ g 9 S RNA wurden in 10 ml 0,5 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,5) auf eine oligo(dT)-Cellulose (Collaborative Research, T₃) Säule (Pasteur-Pipette, 2 ml) aufgetragen. Nach Waschen mit dem Auftragspuffer wurde die Säule zunächst mit 0,1 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,5) und schließlich mit 0,01 M Tris (pH 7,5) eluiert. Die Messung der Extinktion bei 254 nm erfolgte kontinuierlich mittels eines Serva Chromatocords. Die Puffer wurden jeweils gewechselt, wenn die Extinktion die Basislinie erreichte. Das Material der Fraktion des letzten Eluates, das die poly(A)-haltige 9 S RNA darstellt, wurde mit Äthanol bei - 20°C gefällt, in H₂O aufgenommen (1 μ g/ μ l) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2. Isolierung von tRNA und rRNA

3.2.1. Präparation von tRNA (4 S) und rRNA (5 S, 18 S und 28 S) aus Hühnerembryonen

Circa 8 g Rümpfe von 11 Tage alten Hühnerembryonen wurden in 0,9 % NaCl gewaschen und in 15 ml Puffer 6 aufgenommen. Das Material wurde mit 7 Strokes im fest eingepaßten Dounce-Homogenisator zerkleinert und im Spinco Al 30 Rotor bei 11 000 rpm und 0°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der postmitochondriale Überstand wurde nochmals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, und die Sedimente wurden verworfen. Der Überstand wurde möglichst

ohne Lipide gewonnen und im Spinco Ti 50 Rotor bei 49 000 rpm und 0°C für 2 Stunden zentrifugiert. Das Sediment enthält die Polysomen und Monosomen, der Überstand wird als postribosomaler Überstand (PRÜ) zur Isolierung von tRNA verwendet.

Das ribosomale Sediment wurde in Puffer 7 aufgenommen (10 mg/ml) und ebenso wie der PRÜ einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50 : 50 : 1) Extraktion nach Aviv und Leder¹⁴ unterworfen. Die jeweiligen RNAs wurden aus den wässrigen Phasen mit Äthanol gefällt und in H_2O aufgenommen.

Zur weiteren Auftrennung wurden die sogenannte Überstands-RNA (4 S tRNA) und die polysomale RNA auf 15 - 30 %ige Saccharose-Gradienten in Puffer 5 aufgetragen. Die Zentrifugation fand in einem Spinco SW 41 Rotor bei 38 000 rpm und 0°C für 15 Stunden statt. Die Gradienten wurden eluiert und die Extinktion bei 254 nm kontinuierlich gemessen. 4 S, 5 S, 18 S und 28 S RNA wurden aus den jeweiligen Fraktionen mit Äthanol gefällt und in H_2O aufgenommen.

Für die späteren Translationsversuche wurde die RNA über denaturierende Formamid-Gradienten zentrifugiert (Suzuki et al.¹⁵). Je 500 μg Überstands-RNA oder polysomale RNA wurden lyophilisiert und in 0,5 ml Puffer 8 aufgenommen. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde das Material auf 4,6 - 22 % (Gewicht/Gewicht) Saccharose-Gradienten in Puffer 8 aufgetragen. Dann erfolgte die Zentrifugation in einem Spinco SW 41 Rotor bei 39 000 rpm und 25°C für 40 Stunden. Die jeweiligen RNAs wurden mit Äthanol gefällt.

Zur weiteren Reinigung wurden die RNAs einer oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie (siehe Kapitel 3.1.4.) unterworfen. In diesem Falle wurde jedoch das poly(A)-freie

Material aufgefangen, das mit 0,5 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,5) von der Säule eluiert und nach Fällung mit Äthanol in H_2O aufgenommen wurde.

3.2.2. Präparation von tRNA und rRNA aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern

Unreife rote Blutzellen von Hühnern wurden, wie in Kapitel 3.1.1. und 3.1.2. bereits beschrieben, gewonnen und aufgearbeitet. Aus den Polysomen und dem PRÜ wurden durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50 : 50 : 1) Extraktion die jeweiligen RNAs gewonnen und durch Zentrifugation über denaturierende Formamid-Saccharose-Gradienten sowie durch oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie (siehe Kapitel 3.2.1.) weiter aufgetrennt.

3.3. Radioaktive Markierung von 9 S mRNA mit ^{125}J (Knöchel¹⁶)

50 μg 9 S mRNA wurden in 100 μl $6,25 \times 10^{-5}$ M KJ, $7,5 \times 10^{-3}$ M $TlCl_3$, 0,04 M Essigsäure, 0,1 M Na-acetat (pH 5,0) in Gegenwart von 0,5 mCi ^{125}J (trägerfrei) bei 60°C 10 Minuten inkubiert. Nach Abkühlen im Eisbad und nach Zugabe von 10 μl 0,1 M EDTA und 10 μl 0,1 M Na_2SO_3 wurde die Lösung auf eine Sephadex G 25 Säule (0,7 x 22 cm) aufgetragen und mit H_2O eluiert. Dann erfolgte die Extinktionsmessung des Eluates (0,5 ml/Fraktion) bei 260 nm im Bausch & Lomb Spectralphotometer, und die Fraktionen, die die mRNA enthielten, wurden vereinigt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 0,2 M Tris (pH 8,6), 1/20 Volumen 10 %iger SDS-Lösung und 1/10 Volumen 0,1 M EDTA wurde bei 60°C für 20 Minuten inkubiert, die Lösung im Eisbad abgekühlt und ein zweites Mal über

Sephadex G 25 chromatographiert. Das Eluat wurde fraktioniert, und nach Messung der Extinktion bei 260 nm wurden Aliquote zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen. Die Fraktionen, die die jodierte RNA enthielten, wurden vereinigt und lyophilisiert. Nach Umfällen aus Äthanol wurde die RNA in H_2O aufgenommen. Die spezifische Aktivität, die bei diesem Verfahren erreicht wurde, lag bei 2×10^6 dpm/ μ g RNA.

3.4. Isolierung ribosomaler Waschfraktionen (RWF) aus Hühnererythroblasten

Ribosomale Waschfraktionen aus Polysomen von Hühnererythroblasten wurden in Anlehnung an Heywood¹⁷ gewonnen. Circa 100 mg Polysomen wurden in 2 ml Puffer 9 aufgenommen, mit 10 Strokes eines locker eingepaßten Dounce-Homogenisators homogenisiert und eine Stunde bei 0°C vorsichtig gerührt (Vermeidung von Schaumbildung). Die Lösung wurde im Spinco Ti 50 Rotor bei 48 000 rpm und 0°C für 2 Stunden zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C auf eine mit Puffer 10 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (2 x 18 cm) aufgetragen. Die hochmolekularen Anteile des Eluates wurden fraktioniert (circa 0,8 ml/Fraktion) und nach Entnahme eines Aliquotes zur Extinktionsmessung bei 280 nm in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.5. Präparation von zellfreien Proteinbiosynthesesystemen

3.5.1. Präparation eines zellfreien Systems aus Ehrlich Aszites-Zellen (Knöchel et al.¹², Mathews und Korner¹⁸)

Ehrlich Aszites-Zellen der Maus wurden freundlicherweise

von Prof.Dr.E. Liss, Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin, zur Verfügung gestellt und durch intraperitoneale Implantation weitergezüchtet. Die Tiere wurden nach 9 - 10 Tagen durch cervikale Dislokation getötet, die Aszites-Flüssigkeit entnommen und die Zellen in einer Christ Kühlzentrifuge bei 1 500 rpm und 0°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Pasteur-Pipette im Wasserstrahlvakuum abgesaugt. Es folgte dreimaliges Waschen mit Puffer 11. Die Zellen wurden in zweifachem Volumen Puffer 12 unter schwachem Rühren 10 Minuten lysiert und zur vollständigen Zerstörung in einem fest eingepaßten Dounce-Homogenisator mit 30 Strokes nachhomogenisiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen Puffer 13 (bezogen auf das Volumen von Puffer 12) wurde das Lysat zur Entfernung von Zellkernen, Mitochondrien und nicht aufgeschlossenen Zellen im Spinco Al 30 Rotor bei 15 000 rpm und 0°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der postmitochondriale Überstand wurde ohne Lipidschicht in einen Erlenmeyerkolben überführt und nach Zugabe von 1/20 Volumen einer Lösung von 20 mM ATP, 2 mM GTP, 40 mg Kreatinphosphat/ml, 4 mg Kreatinkinase/ml und 1/100 Volumen einer 5 mM Lösung von 20 Aminosäuren 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde dann auf eine mit Puffer 14 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule (2 x 18 cm) aufgetragen, das Eluat in 0,5 ml Fraktionen fraktioniert und das hochmolekulare Material nach Entnahme eines Aliquotes zur Extinktionsmessung bei 260 nm in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.5.2. Präparation eines zellfreien Systems aus Weizenkeimen (Roberts und Paterson¹⁹, Neufang und Tiedemann²⁰)

4 g Weizenkeime, die Dr. G. Schütz, Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin, freundlicherweise zur Verfügung stellte, wurden in einem mit 4 g Seesand gefüllten, eiskalten Mörser und 16 ml Puffer 15 intensiv 5 Minuten gemörsert. Das Homogenat wurde dann im Sorvall SS 34 bei 11 000 rpm und 0°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst lipidfrei abgenommen und nach Zugabe von 1/20 Volumen 20 mM ATP, 0,4 mM GTP, 0,16 M Kreatinphosphat, 0,8 mg Kreatinkinase/ml und 1/400 Volumen 1 M Mg-acetat Lösung für 14 Minuten bei 30°C im Erlenmeyerkolben inkubiert. Nach Abkühlen im Eisbad wurde die Lösung auf eine mit Puffer 16 äquilibrierte Sephadex G 25 Säule aufgebracht. Das Eluat wurde in 0,5 ml/Fraktion fraktioniert und das hochmolekulare Material nach Entnahme eines Aliquotes zur Extinktionsmessung bei 260 nm in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.6. Zellfreie Proteinbiosynthese

3.6.1. Translation im Aszites-System

Die mRNA wurde in Ansätzen zu 50 µl bzw. einem Vielfachen davon translatiert. Jeder Ansatz enthielt folgende Bestandteile:

0,4 E ₂₆₀ Einheiten des Aszites-Extraktes	8,0 µl
18 Aminosäuren (Endkonzentration: 50 µM)	0,5 µl
Cystein (Endkonzentration: 50 µM)	0,5 µl
³ H-Leucin, 1,0 µCi, 58 Ci/mmol	1,0 µl

EGS (Energiereregnerendes System)

ATP (Endkonzentration: 1 mM)

GTP (Endkonzentration: 0,1 mM)

Kreatinphosphat (Endkonzentration: 5 mM)

10 μ g Kreatinkinase 2,5 μ l0,06 E₂₈₀ Einheiten der ribosomalen Waschfraktion 8,5 μ l

20 x M-Puffer

KCl (Endkonzentration: 95 mM)

MgCl₂ (Endkonzentration: 2,5 mM)

Tris-HCl pH 7,5 (Endkonzentration: 20 mM)

2-ME (Endkonzentration: 7 mM) 2,5 μ l

9 S mRNA und/oder H ₂ O	26,5 μ l
	50,0 μ l

Bei den Translationsversuchen, die in Abwesenheit von RWF durchgeführt wurden, war eine Kaliumkonzentration von 65 mM vorgegeben (Knöchel et al.¹²).

Die Ansätze wurden 60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Nach Zugabe von 0,2 ml 0,1 M KOH, 0,01 M Leucin wurde für 20 Minuten bei 37°C weiter inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml γ -Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) und 0,3 ml 30 % TCA wurden die Ansätze 10 Minuten im Eisbad stehen gelassen und dann bei 5 000 rpm und 0°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit jeweils 1 ml 5 % TCA gewaschen. Nach der letzten Waschung wurden die Gläser innen durch Filterföhnchen getrocknet, und nach Aufnahme in Hyamin erfolgte die Messung der Radioaktivität (siehe Kapitel 3.8.1.).

3.6.2. Translation im Weizenkeim-System

Ein 50 μ l Translationsansatz enthielt folgende Bestandteile:

0,4 E ₂₆₀ Einheiten des Weizenkeim-Extraktes	8,0 µl
18 Aminosäuren (Endkonzentration: 50 µM)	0,5 µl
Cystein (Endkonzentration: 50 µM)	0,5 µl
³ H-Leucin, 1,0 µCi, 58 Ci/mmol	1,0 µl
EGS (Energiereregnerendes System)	
ATP (Endkonzentration: 1 mM)	
GTP (Endkonzentration: 0,1 mM)	
Kreatinphosphat (Endkonzentration: 8 mM)	
2 µg Kreatinkinase	2,5 µl
20 x M-Puffer	
K-acetat (Endkonzentration: 110 mM)	
Mg-acetat (Endkonzentration: 3 mM)	
HEPES (pH 7,5) (Endkonzentration: 20 mM)	
2-ME (Endkonzentration: 7 mM)	2,5 µl
9 S mRNA und/oder H ₂ O	<u>35,0 µl</u>
	50,0 µl

Die 60minütige Inkubation wurde bei 25°C durchgeführt. Das restliche Vorgehen unterschied sich nicht vom Translationsansatz im Aszites-System (siehe Kapitel 3.6.1.).

3.6.3. Inkubation von ¹²⁵J markierter RNA

Die Inkubation von ¹²⁵J markierter mRNA in beiden zellfreien Systemen wurde durchgeführt, wie in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, nur statt des radioaktiv markierten Leucins wurde kaltes Leucin verwendet. Die Inkubationsdauer wurde variiert und die Inkubation nach Zugabe von 0,2 ml γ-Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) und 0,2 ml 30 % TCA im Eisbad gestoppt. Die Nachinkubation mit KOH entfiel. Nach 10minütiger Fällung wurde das Präzipitat abzentrifugiert und, wie oben beschrieben, zur Radioaktivitätsmessung vorbereitet.

3.7. Produktanalyse (Knöchel et al.¹²)

3.7.1. Sephadex G 100 Gelfiltration

10 μ g Globin mRNA wurden in Gegenwart von 30 μ g 28 S rRNA in einem zehnfachen Ansatz des zellfreien Aszites-Systems bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Die Translation wurde durch Zugabe von 0,1 ml 0,3 M EDTA-Lösung und durch Abkühlen im Eisbad gestoppt. 50 μ l wurden zur Radioaktivitätsbestimmung nach KOH-Inkubation entnommen. 30 mg unmarkierte Hühner-Globinketten (freundlicherweise von Fr1. K. Dünnbier zur Verfügung gestellt) wurden in 0,5 ml 7 M Harnstoff (pH 2,5) gelöst und nach Vereinigung mit den 450 μ l des zehnfachen Ansatzes 12 Stunden gegen 7 M Harnstoff (pH 2,5) dialysiert. Die Lösung wurde auf eine Sephadex G 100 Säule (1,6 x 100 cm) aufgetragen, die mit 7 M Harnstoff (pH 2,5) eluiert wurde. Es erfolgte die Messung der Extinktion des Eluates (circa 3 ml/Fraktion) bei 280 nm. Jeder Fraktion wurde ein Aliquot von 0,5 ml zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Die Fraktionen, die Globinketten enthielten, wurden vereinigt und für 10 Stunden gegen 6 M Harnstoff, 0,127 M Ameisensäure (pH 3,54; eingestellt mit Triäthylamin) dialysiert.

3.7.2. Carboxymethylcellulose-Chromatographie

Zur Auftrennung der einzelnen Globinketten wurde das Dialysat einer Chromatographie an Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman)-Säulen (0,6 x 15 cm) unterworfen. Eluiert wurde mit einem linearen Gradienten von 100 ml, der als Startpuffer 6 M Harnstoff, 0,127 M Ameisensäure (pH 3,54; eingestellt mit Triäthylamin) und als End-

puffer 6 M Harnstoff, 0,508 M Ameisensäure (pH 5,14; eingestellt mit Triäthylamin) enthielt. Die Extinktion des Eluates (1,7 ml/Fraktion) wurde bei 280 nm gemessen und ein Aliquot zur Radioaktivitätsbestimmung entnommen.

3.8. Radioaktivitätsmessung

3.8.1. Radioaktivitätsmessung von TCA-gefälltem Material

Zu den Proben, von denen die Radioaktivität bestimmt werden sollte, wurden 0,2 ml γ -Globulin (1 mg/ml in 0,9 % NaCl) und 0,3 ml 30 % TCA hinzugefügt. Das Präzipitat wurde nach 10minütigem Stehenlassen im Eisbad in der Christ Kühltzentrifuge bei 5 000 rpm und 0°C für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde zweimal mit jeweils 1 ml 5 % TCA gewaschen. Nach der letzten Waschung wurden die Gläser innen durch Filterföhnchen getrocknet. Das Sediment wurde in 0,5 ml Hyamin (1 M in Methanol) aufgenommen und zur vollständigen Auflösung 15 Minuten in einem Wasserbad bei 57°C inkubiert. Nach Aufnahme in 10 ml einer Lösung aus 4 g Omnifluor/1 Toluol wurden die Aktivitäten der Proben in einem Beckman LS 230 Szintillationszähler gemessen.

3.8.2. Radioaktivitätsmessung von Material in wässriger Lösung (Hendrick et al.²¹)

Die wässrigen Lösungen, deren Radioaktivität bestimmt werden sollte, wurden in 15 ml eines Cocktails aufgenommen, der folgende Zusammensetzung hat:

7,5 g PPO, 0,15 g Dimethyl-POPOP in 670 ml Toluol und 330 ml Äthylenglycolmonomethyläther und 35 ml Hyamin

(1 M in Methanol).

Die Messung erfolgte im Beckman LS 230 Szintillationszähler.

3.9. Puffer

- Puffer 1 0,14 M NaCl, 0,004 M MgCl_2 , 0,005 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,4).
- Puffer 2 0,004 M MgCl_2 , 0,02 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,006 M an 2-ME gemacht.
- Puffer 3 0,01 M MgCl_2 , 0,8 M KCl, 0,1 M Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,06 M an 2-ME gemacht.
- Puffer 4 0,005 M MgCl_2 , 0,1 M KCl, 0,02 M Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,06 M an 2-ME gemacht.
- Puffer 5 0,08 M NaCl, 0,001 M EDTA, 0,01 M Tris (pH 7,5).
- Puffer 6 0,25 M Saccharose, 0,15 M KCl, 0,005 M MgCl_2 , 0,02 M Tris (pH 7,5).
- Puffer 7 0,1 M NaCl, 0,001 M EDTA, 1 % SDS, 0,1 M Tris (pH 9).
- Puffer 8 70 % Formamid, 0,003 M EDTA, 0,003 M Tris (pH 7,4).
- Puffer 9 0,5 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,5).
- Puffer 10 0,1 M KCl, 0,002 M MgCl_2 , 0,01 M Tris (pH 7,5).
- Puffer 11 0,146 M NaCl, 0,01 M Tris (pH 7,8).

- Puffer 12 0,0015 M MgCl_2 , 0,015 M KCl, 0,01 M Tris (pH 7,5).
- Puffer 13 0,04 M MgCl_2 , 0,8 M KCl, 0,2 M Tris (pH 7,5).
Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,06 M an 2-ME gemacht.
- Puffer 14 0,004 M MgCl_2 , 0,08 M KCl, 0,02 M Tris (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,006 M an 2-ME gemacht.
- Puffer 15 0,001 M Mg-acetat, 0,1 M KCl, 0,002 M $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,02 M HEPES (pH 7,6). Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,006 M an 2-ME gemacht.
- Puffer 16 0,005 M Mg-acetat, 0,12 M K-acetat, 0,02 M HEPES (pH 7,5). Der Puffer wurde vor Gebrauch 0,006 M an 2-ME gemacht.

3.10. Chemikalien

Chemikalien folgender Firmen wurden verwendet:

^3H -Leucin (58 Ci/mmol), ^{125}Jod , trägerfrei, (14 Ci/mg),
The Radiochemical Center, Amersham Buchler GmbH & Co. KG,
Wenden über Braunschweig.

Hyamin (1 M in Methanol), Fa. Packard Instrument International S.A., Zürich/Schweiz.

Omnifluor, Fa. New England Nuclear, Dreieichenhain/
Frankfurt am Main.

Dimethyl-POPOP (1.4 bis 2(-4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol), Werner Zinsser, Frankfurt.

Oligo(dT)-Cellulose, Collaborative Research, Inc.,
Waltham, Mass., USA.

Saccharose (frei von Ribonuclease), Fa. Serva, Heidelberg.

PPO (2.5-Diphenyloxazol), Äthylenglycolmonomethyläther

p.A., EDTA (Äthyldiamintetraessigsäure) p.A., Tri-
äthylamin p.A., Trichloressigsäure p.A. Fa. Merck,
Darmstadt.

Alle übrigen Substanzen wiesen den Reinheitsgrad p.A.
auf.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung von 9 S mRNA, 5 S, 18 S und 28 S rRNA sowie von 4 S tRNA

4.1.1. Isolierung von Globin mRNA

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Globin mRNA dienten unreife rote Blutzellen von Hühnern. Die Tiere wurden durch subcutane Injektionen von Phenylhydrazin vorbehandelt, was zu einer makrozytären, normochromen Anämie führte (Schall und Turba¹³). Diese Behandlung ist notwendig, weil nur in unreifen roten Blutzellen und nicht in ausgereiften Erythrozyten ein hoher Globin mRNA-Gehalt vorliegt. Die Empfindlichkeit von mRNA gegenüber Ribonuclease ist allgemein sehr hoch. Trotzdem wurde auf Zusatz jeglicher RNAase-Inhibitoren verzichtet, weil deren Verwendung möglicherweise die Translationsansätze stören könnte. Statt dessen wurde die Isolierung der Globin mRNA bei Temperaturen von 0 - 4°C in möglichst kurzer Zeit durchgeführt. Die gereinigten Blutzellen wurden durch einen hypotonen Puffer lysiert, und durch niedertourige Zentrifugation, bei der Zellkerne und nicht aufgeschlossene Zellen entfernt wurden, konnte der postmitochondriale Überstand (PMÜ) gewonnen werden. Hochtourige Zentrifugation des PMÜ bewirkte die Sedimentation der Polysomen. Nach EDTA-Zugabe, welche eine Komplexierung von Mg^{2+} zur Folge hat, dissoziieren die Polysomen in mRNP-Komplex und die beiden ribosomalen Untereinheiten. Diese Komplexe wurden durch eine Zonal-Gradienten-Zentrifugation voneinander getrennt (Schröter²²). Abb. 1 zeigt die Extinktion des Eluates bei 254 nm.

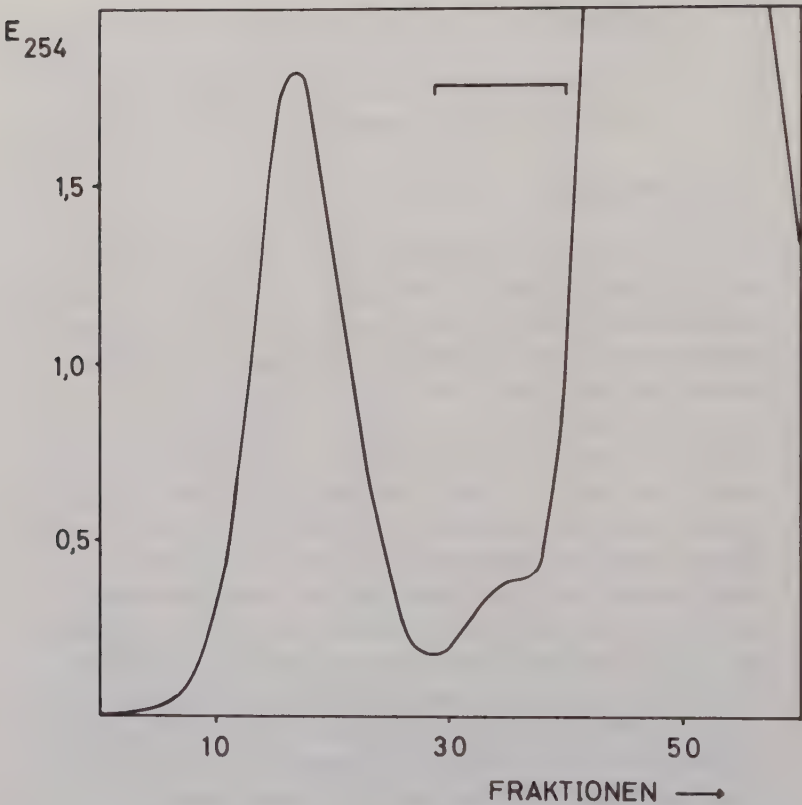


Abb. 1: Circa 300mg Polysomen wurden durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 0,03 M) dissoziiert und auf einen 7 - 32 % Saccharose-Gradienten in Puffer 5 aufgetragen. Zentrifugiert wurde in einem Spinco Ti 14 Zonal Rotor bei 32 000 rpm und 0°C für 24 Stunden.
 — Extinktion bei 254 nm.

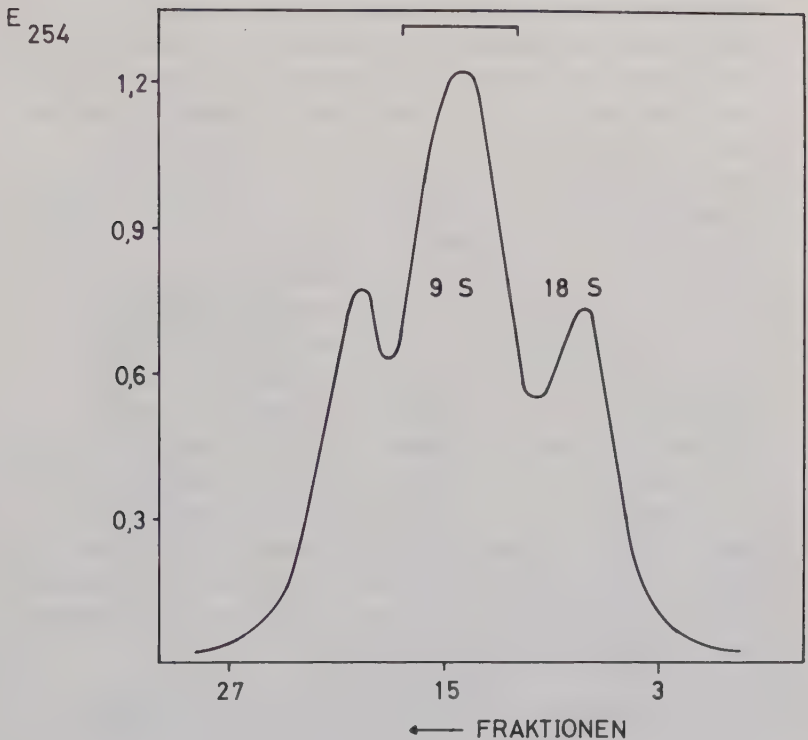


Abb. 2: Die durch Klammer gekennzeichneten Fraktionen der Zonal-Gradienten-Zentrifugation (siehe Abb. 1) wurden vereinigt, das Material nach Zugabe von 1 % SDS und 2 % NaCl mit 2 Volumen 96 %igem Äthanol gefällt und zweimal mit 66 %igem Äthanol gewaschen. Je 0,3 mg RNA wurden auf 15 - 30 %ige (Gewicht/Volumen) Saccharose-Gradienten in Puffer 5 aufgetragen und im Spinco SW 27 Rotor bei 27 000 rpm und 0°C für 45 Stunden zentrifugiert. Die durch Klammer gekennzeichneten Fraktionen wurden vereinigt. — Extinktion bei 254 nm.

Die Fraktionen, die den mRNP-Komplex enthielten, wurden vereinigt. Nach Zugabe von SDS, was zu einer weitgehenden Abdissoziation der Proteine führt, erfolgte die Fällung des Materials mit Alkohol. Die RNA wurde durch eine weitere Saccharose-Gradienten-Zentrifugation weiter aufgetrennt (Abb. 2). Die Fraktionen des 9 S Peaks wurden zur vollständigen Abtrennung der Proteine einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion unterworfen. Die auf diese Weise isolierte 9 S RNA wurde zur weiteren Reinigung an oligo(dT)-Cellulose chromatographiert (Aviv und Leder¹⁴). Diese Chromatographie bewirkt, daß RNA-Spezies mit poly(A)-Sequenzen - Hühner Globin mRNA enthält eine poly(A)-Sequenz von durchschnittlich 60 Nucleotiden Länge (Knöchel et al.²³) - bei hohem Salzgehalt auf der Säule durch Hybridisierung retiniert werden, während poly(A)-freie RNA-Spezies, wie z.B. rRNA, hindurchlaufen. Poly(A)-haltige mRNA kann dann mit Puffern niedrigen Salzgehaltes bzw. H₂O von der Säule heruntergewaschen werden. Abb. 3 zeigt das Elutionsprofil bei Auftrag von 9 S RNA und Waschen mit Puffern absteigender Ionenkonzentration.

4.1.2. Isolierung von 5 S, 18 S und 28 S rRNA sowie von 4 S tRNA

Zur Isolierung der rRNA und der tRNA wurden einmal unreife rote Blutzellen verwendet. Diese Zellen enthalten vorwiegend 9 S Globin mRNA, sodaß eine mögliche Kontamination der 18 S und 28 S rRNA mit anderen höhermolekularen mRNA-Spezies weniger wahrscheinlich ist. Zum anderen wurden Rümpfe von Hühnerembryonen verwendet, wobei in diesen Fällen eine mögliche Kontamination der rRNA und der tRNA mit Globin mRNA weniger wahrschein-

E 254

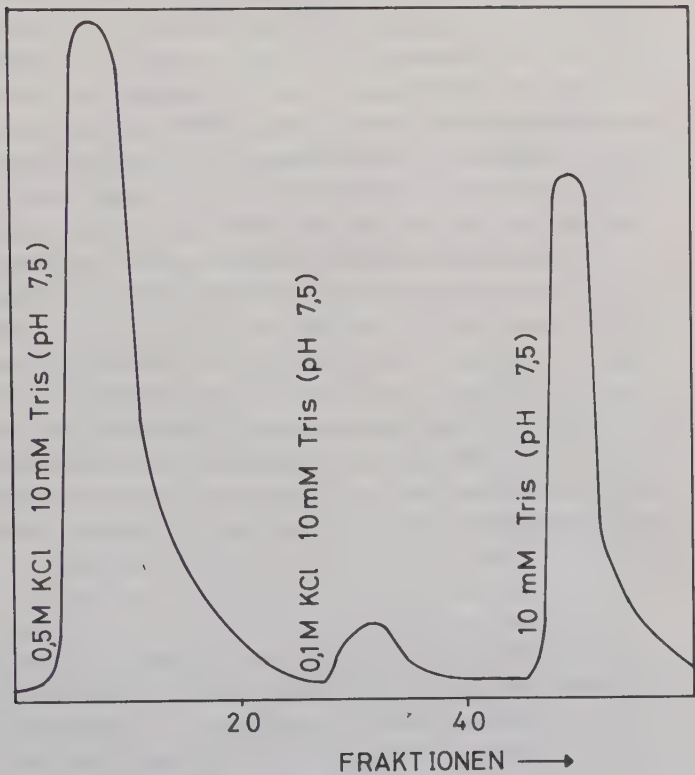


Abb. 3: Circa 900 μg 9 S RNA wurden in 0,5 M KCl, 10 mM Tris (pH 7,5) auf eine oligo(dT)-Cellulose (Collaborative Research, T_3) Säule (Pasteur-Pipette, 2 ml) aufgetragen. Nach längerem Waschen mit dem Auftragspuffer wurde die Säule mit Puffern absteigender Ionenkonzentration eluiert. Die Puffer wurden gewechselt, wenn die Extinktion die Basislinie erreichte. — Extinktion bei 254 nm.

lich ist als bei Verwendung von unreifen roten Blutzellen. Aus beiden Materialien wurde durch niedrigtourige Zentrifugation des Lysates bzw. des Homogenates der PMÜ gewonnen. Der PMÜ wurde durch hochtourige Zentrifugation in ein Sediment, das die Polysomen und Monosomen enthält, und einen postribosomalen Überstand (PRÜ) aufgetrennt. Durch Phenol / Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion wurden aus dem Sediment die rRNA-Spezies und aus dem PRÜ die tRNA isoliert. Zur weiteren Reinigung wurden die RNAs zunächst einer oligo (dT)-Cellulose-Chromatographie (Aviv und Leder¹⁴) unterworfen - wobei poly(A)-haltige RNA-Spezies eliminiert wurden - und dann durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation weiter aufgetrennt. Um Aggregatbildung zu vermeiden, wurde ein Teil der RNA in Formamid als denaturierendem Lösungsmittel zentrifugiert (Suzuki et al.¹⁵). Die Fraktionen, die die jeweiligen RNA-Spezies enthielten, wurden vereinigt und die RNA mit Äthanol gefällt.

4.2. Jodierung der mRNA mit ^{125}J (Knöchel¹⁶)

Um eine eventuelle Degradierung der mRNA während der Translation in den Inkubationsansätzen untersuchen zu können, wurde ein Teil der mRNA mit ^{125}J radioaktiv markiert. Bei diesem Verfahren wird das Wasserstoff-Atom in der C₅ Position der Cytosinreste mit TiCl_3 als Katalysator durch Jod substituiert. Der Vorteil dieser in vitro Markierung liegt darin, daß sehr hohe spezifische Aktivitäten ($>10^6$ dpm/ μg RNA) erreicht werden können. Weiterhin wird das Hybridisierungsvermögen der RNA-Moleküle durch die Jodierung nicht beeinträchtigt.

4.3. Präparation der zellfreien Systeme und von ribosomalen Waschfraktionen (RWF)

In dieser Studie wurde mit zwei unterschiedlichen Systemen gearbeitet, um die Translation von Globin mRNA in Gegenwart von tRNA und rRNA zu untersuchen, nämlich dem System aus Ehrlich Aszites-Zellen und dem Weizenkeim-System. Hierbei ist vorteilhaft, daß beide Systeme keine endogene Globinsynthese aufweisen, was die Untersuchung auf neu synthetisierte Globinketten nach Zugabe von Globin mRNA erheblich vereinfacht.

4.3.1. Aszites-System

Das zellfreie System aus Ehrlich Aszites-Zellen wurde von Mathews und Korner¹⁸ entwickelt. Dieses Tumorzellsystem wurde bereits zur Translation von Histon mRNA (Jacobs-Lorena et al.²⁴), Kalbslinsen mRNA (Bloemen-dal²⁵) sowie von Maus- und Kaninchen Globin mRNA (Mathews und Korner¹⁸, Mathews et al.²⁶) verwendet. Um die endogene mRNA herabzusetzen, wurde bei der Präparation eine 30minütige Vorinkubation durchgeführt, wobei ein Teil der endogenen mRNA zerstört wird. Andererseits werden durch die Vorinkubation Translationsfaktoren zerstört, was eine Herabsetzung der Proteinbiosynthese zur Folge hat (siehe Kapitel 4.4.3.).

4.3.2. Weizenkeim-System

Das zweite System, das zur Translation von Globin mRNA verwendet wurde, war das zellfreie System aus Weizenkeimen. Dieses System, das von Roberts und Paterson¹⁹ 1973 zuerst beschrieben wurde, konnte bereits mit Er-

folg zur Translation verschiedener eukaryotischer mRNA-Spezies eingesetzt werden (Roberts und Paterson¹⁹, Benveniste et al.²⁷, Boedtker et al.²⁸, Neufang und Tiedemann²⁰). Im Unterschied zur Präparation des Aszites-Systems wurde beim Weizenkeim-System eine Vorinkubationszeit von 14 Minuten und die Verwendung von Acetat-Ionen statt Chlorid-Ionen gewählt.

4.3.3. Ribosomale Waschfraktionen (RWF)

Zur Isolierung der ribosomalen Waschfraktionen (RWF) wurden Polysomen von Hühnererythroblasten mit 0,5 M KCl extrahiert (Heywood¹⁷). Durch diese Behandlung wird ein Teil der Translationsfaktoren abdissoziiert. Aus der Zugabe dieser ribosomalen Waschfraktionen zu dem zellfreien System aus Ehrlich Aszites-Tumorzellen resultiert eine Stimulierung der durch Zugabe exogener mRNA bewirkten Proteinbiosynthese (Mathews et al.²⁹, Metafora et al.³⁰, Lebleu et al.³¹).

4.4. Translation der Globin mRNA im Aszites-System in Abwesenheit und Gegenwart von 4 S, 5 S, 18 S und 28 S RNA

4.4.1. Translation in Gegenwart von RWF

Bei diesem Versuch wurde in einer Reihe von Inkubationsansätzen der Einbau von ³H-Leucin in TCA-fällbare Peptide in Abhängigkeit von der Konzentration der verschiedenen RNA-Spezies untersucht. Darüber hinaus wurde die Translation verschiedener Konzentrationen von Globin mRNA in Gegenwart von jeweils 2 µg an 4 S, 5 S, 18 S bzw. 28 S RNA verfolgt (Abb.4).

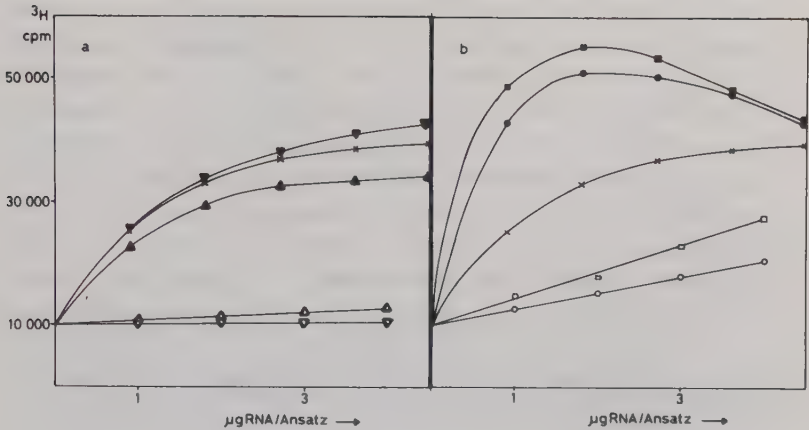


Abb. 4 a und b:

Translation bzw. Inkubation von

a) 9 S mRNA x-x-x, 5 S rRNA Δ - Δ - Δ , 4 S tRNA ∇ - ∇ - ∇ ,
 9 S mRNA in Gegenwart von 2 μ g 5 S rRNA $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ und
 9 S mRNA in Gegenwart von 2 μ g 4 S tRNA $\blacktriangledown$ - $\blacktriangledown$ - $\blacktriangledown$

b) 9 S mRNA x-x-x, 18 S rRNA o-o-o-o, 28 S rRNA $\square$ - $\square$ - $\square$,
 9 S mRNA in Gegenwart von 2 μ g 18 S rRNA $\bullet$ - $\bullet$ - $\bullet$ und
 9 S mRNA in Gegenwart von 2 μ g 28 S rRNA $\blacksquare$ - $\blacksquare$ - $\blacksquare$
 im Aszites-System in Gegenwart von RWF. Die Inkuba-
 tionsdauer betrug bei 37°C 60 Minuten.

Der Versuch zeigt, daß 4 S und 5 S RNA das System nicht stimulieren können, 18 S und 28 S RNA eine geringe und Globin mRNA eine hohe Stimulation bewirken. Die Zugabe von 4 S und 5 S RNA bei der Translation von Globin mRNA zeigt keine Erhöhung des ^3H -Leucin Einbaues, verglichen mit dem Einbau in Gegenwart von mRNA bei Abwesenheit von 4 S und 5 S RNA. Im Falle der Zugabe von 5 S rRNA wird im Gegenteil eine geringfügige Hemmung der Proteinbiosynthese beobachtet. Die Konzentrationsreihe der mRNA in Gegenwart und Abwesenheit von 4 S tRNA ist identisch, d.h., das Aszites-System ist unabhängig von exogener tRNA. Dieser Befund steht im Widerspruch zu älteren Arbeiten über dieses zellfreie System (Aviv et al.³², Metafora et al.³⁰), wird aber von anderen Autoren (Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰, Mathews³³) bestätigt, wobei die Art der Präparation (Dialyse oder Sephadex Gelfiltration) entscheidend sein soll (Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰).

Die Tatsache, daß 18 S und 28 S RNA das Aszites-System bei Abwesenheit von exogener mRNA zu stimulieren vermögen, gab zu weiteren Versuchen Anlaß. In der Literatur wurde über eine Aggregation von Globin mRNA an rRNA berichtet (Kabat⁹). Um diesen Effekt ausschließen zu können, wurde die rRNA über oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie (Aviv und Leder¹⁴) von poly(A)-haltigen Spezies befreit und anschließend über denaturierende Formamid-Saccharose-Gradienten (Suzuki et al.¹⁵) zentrifugiert. Ferner wurden als Ausgangsmaterial zur Gewinnung der rRNA Polysomen aus unreifen roten Blutzellen und Polysomen aus 11 Tage alten Hühnerembryonen verwendet. Trotz unterschiedlicher Herkunft war die Stimulation durch rRNA gleich hoch.

Als wichtigste Beobachtung ergibt sich bei diesem Versuch, daß die Stimulation der Proteinbiosynthese durch mRNA in Gegenwart von 18 S und 28 S RNA weiter gesteigert wird. Diese Steigerung ist höher als die Summe der durch mRNA oder 18 S bzw. 28 S RNA allein bewirkten Stimulationen. Dieser Effekt beschränkt sich aber nur auf niedrige Konzentrationen an 9 S mRNA. Steigt die Konzentration von mRNA über $2\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ Ansatz, so gleicht sich der Einbau von ^3H -Leucin in Gegenwart und in Abwesenheit von rRNA an.

4.4.2. Translation in Abwesenheit von RWF

Der nächste Versuch sollte die Frage beantworten, ob die im vorigen Kapitel beobachtete Stimulation des zellfreien Systems durch rRNA und die weitere Steigerung von mRNA in Gegenwart von rRNA auf das Vorhandensein der RWF zurückgeht. Es wäre denkbar, daß diese Effekte auf die Ausschaltung eines Inhibitors in der RWF durch Zugabe von rRNA zustande kommen.

Abb. 5 zeigt die Konzentrationsreihe von mRNA und 28 S rRNA sowie von mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA im zellfreien Aszites-System bei Abwesenheit von RWF. Der Verlauf der Stimulationskurve mit mRNA bestätigt die von Knöchel et al.¹² erzielten Ergebnisse, daß

- 1.) die Stimulationsrate geringer ist und daß
- 2.) die Sättigung des Systems bei geringeren Konzentrationen an mRNA eintritt als in Gegenwart von RWF. Jedoch werden die oben genannten Effekte (Stimulierung durch 28 S rRNA, weitere Stimulation von mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA) auch in Abwesenheit von RWF beobachtet, was eine Beteiligung der RWF an diesen Effekten ausschließt.

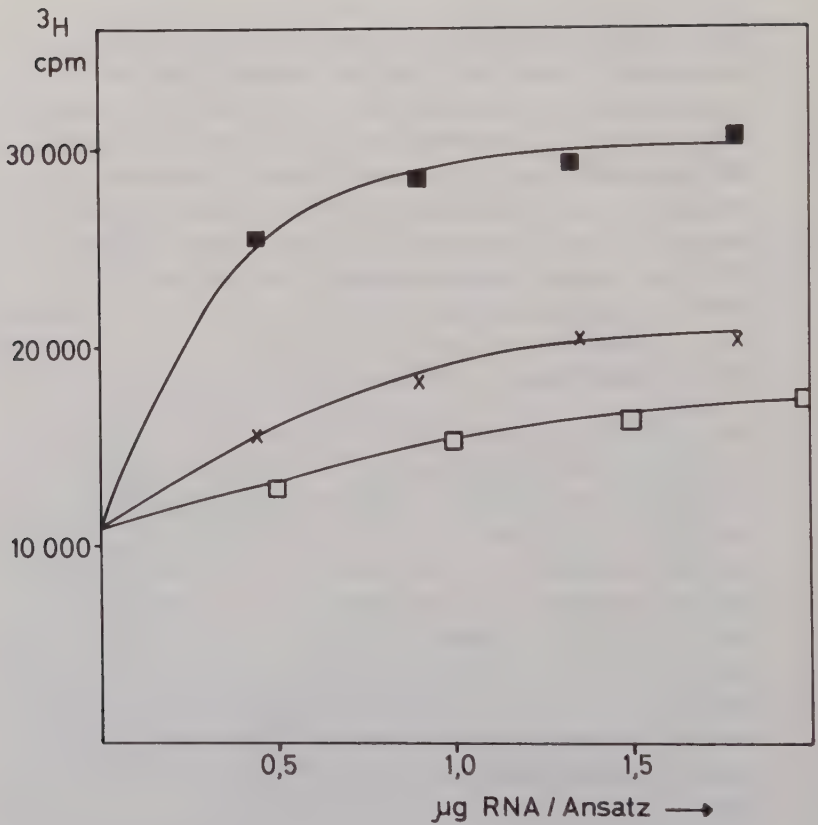


Abb. 5: Translation bzw. Inkubation von 9 S mRNA x-x-x, 28 S rRNA □-□-□ und 9 S mRNA in Gegenwart von 2 μg 28 S rRNA ■-■-■ im Aszites-System in Abwesenheit von RWF. Die Inkubationsdauer betrug bei 37°C 60 Minuten.

4.4.3. Translation im Aszites-System bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten

Die bisher erzielten Resultate lassen sich in verschiedener Weise deuten. Es ist nicht auszuschließen, daß die RNA (18 S und 28 S) eine spezifische Aktivierung des Translationsprozesses bewirkt. Setzt man weiterhin voraus, und dies wird in späteren Versuchen sehr wahrscheinlich (siehe Kapitel 4.5.1.), daß die rRNA-Präparation keine mRNA enthält, so dürfte die durch Zugabe allein von rRNA zum Aszites-System beobachtete Stimulierung auf einer Steigerung der durch endogene mRNA verursachten Proteinbiosynthese beruhen. Analog würde die durch exogene mRNA hervorgerufene Proteinbiosynthese gesteigert. Andererseits lassen sich die Effekte auch durch spezifische RNAase-Wirkung auf exogene und endogene mRNA erklären, wobei 18 S und 28 S rRNA einen kompetitiven Schutz bewirken konnten.

Im folgenden Versuch wurde die Translation von 9 S mRNA, 9 S mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA und die Inkubation von 28 S rRNA allein in Aszites-Präparationen die zusätzlich 0, 10 oder 25 Minuten vorinkubiert wurden, untersucht (Abb. 6a, b und c). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß diese Werte zu der ursprünglichen Vorinkubationszeit von 30 Minuten (siehe Kapitel 3.5.1.) addiert werden müssen. Die absoluten Einbauraten von ^3H -Leucin in TCA-fällbare Peptide nahmen mit steigender Vorinkubationszeit ab. Demgegenüber weisen die Stimulationsraten (in %) der einzelnen RNA-Spezies ein unterschiedliches Verhalten auf. Wie aus Tabelle I hervorgeht, nahm die durch 9 S mRNA bewirkte Stimulation gering zu, während die von 9 S mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA und die von 28 S rRNA allein abnahmen.

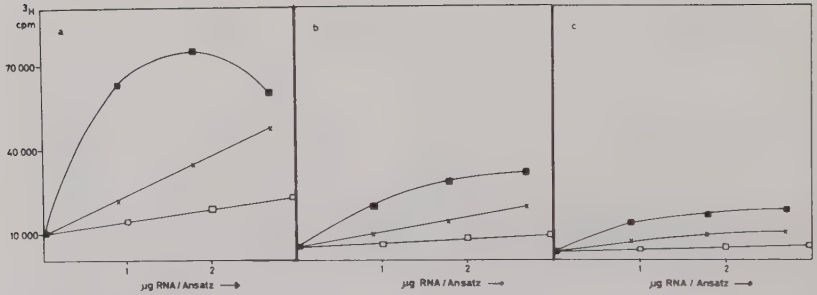


Abb. 6 a, b und c: Translation bzw. Inkubation von 9 S mRNA x-x-x, 28 S rRNA □-□-□ und 9 S mRNA in Gegenwart von 2 µg 28 S rRNA ■-■-■ im Aszites-System in Gegenwart von RWF. Das Aszites-System wurde zusätzlich zu der bei der Präparation durchgeführten Inkubation von 30 Minuten nochmals vorinkubiert. Daraus resultieren Vorinkubationszeiten von 30 min (a), 40 min (b) und 55 min (c).

Tabelle I

^3H -Leucin Einbau (cpm) und Stimulationsrate (%) im Aszites-System nach unterschiedlichen Vorinkubationszeiten.

Stimulationsrate:

$$\frac{{}^3\text{H (cpm) mit exogener RNA} - {}^3\text{H (cpm) endogener RNA}}{{}^3\text{H (cpm) mit endogener RNA}} \times 100$$

Vorinkuba- tionszeit	1 µg 9 S mRNA			1 µg 28 S rRNA		1 µg 9 S mRNA + 2 µg 28 S rRNA	
	$^3\text{H (cpm)}$	$^3\text{H (cpm)}$	(%)	$^3\text{H (cpm)}$	(%)	$^3\text{H (cpm)}$	(%)
30 Min.	10 030	21 090	110	14 137	41	65 793	556
40 Min.	4 530	9 699	114	6 112	35	18 761	314
55 Min.	3 092	6 860	122	3 928	27	12 332	299

In allen Fällen jedoch war die durch 9 S in Gegenwart von 28 S bewirkte Stimulation größer als die Summe der durch 9 S allein bzw. 28 S allein erreichten Werte.

4.5. Translation der Globin mRNA im Weizenkeim-System in Abwesenheit und Gegenwart von 4 S, 5 S, 18 S und 28 S RNA

Die folgenden Versuchsansätze sollten Aufschluß darüber geben, ob die Ergebnisse, die im Aszites-System erzielt wurden, sich in einem anderen zellfreien System, nämlich dem aus Weizenkeimen, reproduzieren lassen.

In der Literatur (Roberts und Paterson¹⁹, Neufang und Tiedemann²⁰, Benveniste et al.²⁷, Boedtker et al.²⁸)

wurde die Translation im Weizenkeim-System bisher nur ohne die Zugabe von RWF beschrieben; deshalb wurden zunächst Versuche durchgeführt, bei denen kein RWF zugegeben wurde.

4.5.1. Translation in Abwesenheit von RWF

In Anlehnung an den Versuch in Kapitel 4.4.1. wurde in einer Reihe von Inkubationsansätzen der Einbau von ^3H -Leucin in TCA-fällbare Peptide im Weizenkeim-System untersucht. Unter den gewählten Bedingungen ist das Weizenkeim-System schon mit 1/10 der Menge an mRNA gesättigt, die zur optimalen Translation im Aszites-System benötigt wird. Deshalb wurde auch nur 1/10 der Menge an tRNA und rRNA in das Weizenkeim-System gegeben, wenn die mRNA im Beisein dieser RNA-Spezies translatiert wurde. Aus Abb. 7 a und b ist zu ersehen, daß 4 S und 5 S RNA analog ihrem Verhalten im Aszites-System das Weizenkeim-System nicht stimulieren. Darüber hinaus weisen 18 S und 28 S RNA - dies im Gegensatz zum Aszites-System - auch keine Stimulierung auf. Dieser Befund macht eine Kontamination der rRNA mit mRNA sehr unwahrscheinlich. Bei gleichzeitigem Vorhandensein der verschiedenen RNA-Spezies bei der Translation von Globin mRNA erfolgt also in diesem System keine weitere Stimulierung im Gegensatz zum Verhalten des Aszites-Systems auf Zugabe von 18 S und 28 S rRNA. Erwähnenswert ist die Tatsache, daß auch im Weizenkeim-System eine Hemmung der Stimulation von mRNA in Gegenwart von 5 S rRNA zu erkennen ist (wie schon im Aszites-System beobachtet). Die im Aszites-System erzielten Ergebnisse scheinen somit keine generellen Eigenschaften zellfreier Systeme

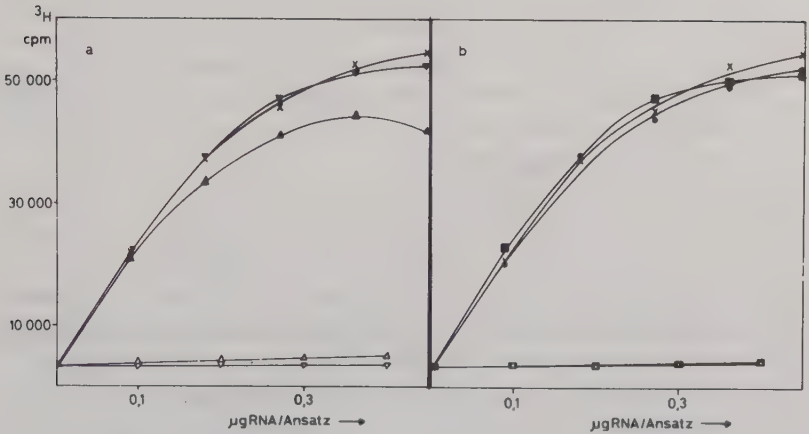


Abb. 7 a und b:

Translation bzw. Inkubation von

a) 9 S mRNA x-x-x, 5 S rRNA Δ - Δ - Δ , 4 S tRNA ∇ - ∇ - ∇ ,
 9 S mRNA in Gegenwart von 0,2 μ g 5 S rRNA $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ und
 9 S mRNA in Gegenwart von 0,2 μ g 4 S tRNA $\blacktriangledown$ - $\blacktriangledown$ - $\blacktriangledown$

b) 9 S mRNA x-x-x, 18 S rRNA o-o-o-o, 28 S rRNA $\square$ - $\square$ - $\square$,
 9 S mRNA in Gegenwart von 0,2 μ g 18 S rRNA $\bullet$ - $\bullet$ - $\bullet$ und
 9 S mRNA in Gegenwart von 0,2 μ g 28 S rRNA $\blacksquare$ - $\blacksquare$ - $\blacksquare$ im
 Weizenkeim-System in Abwesenheit von RWF. Die Inkuba-
 tionsdauer betrug bei 25°C 60 Minuten.

zu sein. Der Befund, daß 18 S und 28 S rRNA das Aszites-System stimulieren, und daß die Gegenwart dieser beiden rRNA-Spezies die Stimulation durch mRNA weiter erhöht, legt den Schluß nahe, daß es sich hierbei um eine Eigenart des Aszites-Systems zu handeln scheint. Weitere Versuche zur Klärung dieser Frage und speziell zum Vergleich des RNAase-Gehaltes beider Systeme werden im Kapitel 4.7. beschrieben.

4.5.2. Translation in Gegenwart von RWF

Um zu sehen, wie sich das Weizenkeim-System in Gegenwart von RWF verhält, wurde Globin mRNA bei gleichen Ionenkonzentrationen in Abwesenheit und in Gegenwart von zwei verschiedenen RWF-Konzentrationen translatiert (Abb. 8). Das Ergebnis zeigt, daß das Weizenkeim-System unter den genannten Bedingungen im Gegensatz zum Aszites-System in Gegenwart von RWF keine Steigerung der Stimulationsrate erfährt; mit steigender RWF-Konzentration wird im Gegenteil das System stärker gehemmt. Ob hierfür unzureichende experimentelle Bedingungen (z.B. wurden die Ionenkonzentrationen nicht weiter variiert, und es wurden Chlorid-Ionen zugegeben) verantwortlich sind oder ob es sich um spezifische Inhibitoren des tierischen Extraktes gegen das pflanzliche System handelt, wurde nicht näher untersucht.

4.6. Produktanalyse der Translationsansätze des Aszites-Systems

Um herauszufinden, ob die im Aszites-System durch Zugabe von 18 S und 28 S rRNA bewirkte weitere Stimulierung der Proteinbiosynthese in Gegenwart von Globin mRNA

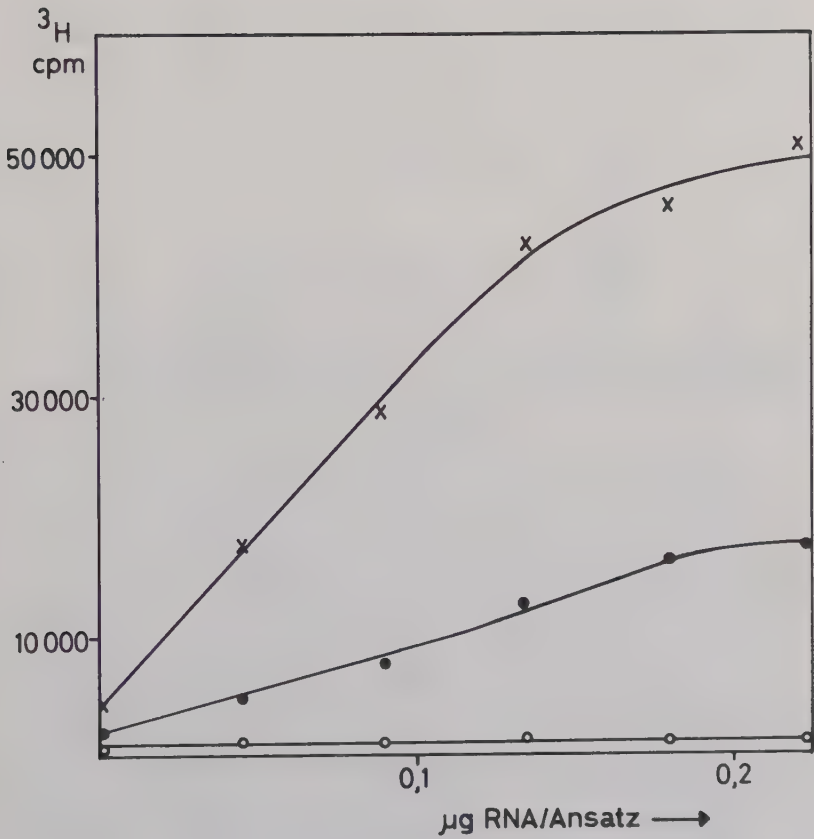


Abb. 8:

Translation von 9 S mRNA im Weizenkeim-System in Abwesenheit x-x-x und in Gegenwart von 0,015 E_{280} RWF ●-●-● und 0,06 E_{280} RWF o-o-o-o. Die Inkubationsdauer betrug bei 25°C 60 Minuten.

ausschließlich auf die Synthese von Globinketten zurückzuführen ist oder ob es sich um die Synthese von Aszites-eigenen Proteinen handelt, wurde eine Produktanalyse der in Gegenwart von 28 S rRNA stimulierten Ansätze auf Globinketten durchgeführt.

Zehnfache Translationsansätze von

- 1.) 9 S mRNA
- 2.) 28 S rRNA
- 3.) 9 S mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA
- 4.) einer Kontrolle in Abwesenheit exogener RNA

wurden 60 Minuten inkubiert. Nach Abnahme eines Aliquotes zur Berechnung der Gesamteinbaurate (siehe Tabelle II, Spalte 1) wurden die Ansätze mit je 30 mg nicht markierter Globinketten versetzt und in 7 M Harnstoff (pH 2,5) auf Sephadex G 100 Säulen chromatographiert. Die den Globinketten entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt. Eine Auftrennung in die einzelnen Globinketten erfolgte durch Chromatographie an Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman).

Abb. 9 a und b zeigen die Extinktion der Säuleneluate bei 280 nm sowie die Radioaktivität von Aliquoten der einzelnen Fraktionen. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nur 60 % der aufgetragenen Globinketten von der Carboxymethylcellulose-Säule eluierbar sind (Knöchel et al.²³), läßt sich die Gesamtradioaktivität in den Fraktionen der Globinketten berechnen und in Relation zum Gesamteinbau von ³H-Leucin in TCA-fällbares Material setzen (Tabelle II). Das Ergebnis zeigt, daß bei der Translation von 9 S mRNA sowie von 9 S mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA über 80 % Globinketten synthetisiert werden. Hiermit ist bewiesen, daß die erhöhte Proteinsyntheserate bei Zugabe von 9 S mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA auf die Synthese von Globin-

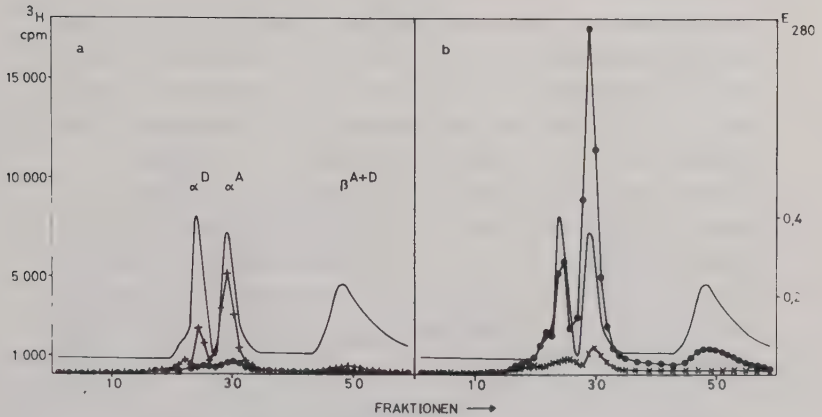


Abb. 9 a und b: Zehnfache Ansätze mit $9 \mu\text{g}$ 9 S mRNA, $30 \mu\text{g}$ 28 S rRNA, $9 \mu\text{g}$ 9 S mRNA in Gegenwart von $30 \mu\text{g}$ 28 S rRNA und eine Kontrolle ohne exogene RNA wurden im Aszites-System im Beisein von RWF 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Entnahme eines Aliquotes von $50 \mu\text{l}$ zur Radioaktivitätsbestimmung (siehe Tabelle II) und Zugabe von jeweils 30 mg unmarkierter Globinketten wurden die Ansätze auf Sephadex G 100 Säulen ($1,6 \times 100 \text{ cm}$) in 7 M Harnstoff ($\text{pH } 2,5$; eingestellt mit HCl) chromatographiert. Die die Globinketten enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt. Eine Auftrennung in die einzelnen Globinketten erfolgte durch Chromatographie auf Carboxymethylcellulose (CM 52, Whatman)-Säulen ($0,6 \times 15 \text{ cm}$) durch einen linearen 100 ml Gradienten. Startpuffer: 6 M Harnstoff, $0,127 \text{ M}$ Ameisensäure ($\text{pH } 3,54$; eingestellt mit Triäthylamin), Endpuffer: 6 M Harnstoff, $0,508 \text{ M}$ Ameisensäure ($\text{pH } 5,14$; eingestellt mit Triäthylamin). — Extinktion bei 280 nm , $\text{cpm } ^3\text{H}$ -Leucin eingebaut in Gegenwart von a) Kontrolle ohne RNA $\bullet\text{--}\bullet\text{--}\bullet$ und mRNA $+\text{--}+\text{--}+$, b) mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA $\bullet\text{--}\bullet\text{--}\bullet$ und 28 S rRNA $\times\text{--}\times\text{--}\times$.

ketten zurückzuführen ist. Demgegenüber liegt die Syntheserate von Globinketten bei Zugabe von 28 S rRNA allein unter 10 %. Diese geringe Syntheserate kann durch kleinste Mengen an Globin mRNA bewirkt sein, die mit der ribosomalen Waschfraktion in das System eingebracht werden und deren Translation in Gegenwart von 28 S rRNA weiter stimuliert wird. Andererseits läßt sich nicht mit Sicherheit feststellen, ob es sich hierbei tatsächlich um eine Globinkettensynthese handelt. Es könnte sich auch um Aszites-Proteine handeln, die zufällig bei gleichen Ionenstärken eluieren wie Globinketten.

Tabelle II

Gesamtproteinsynthese und Globinkettensynthese im Aszites-System. Der ^3H -Leucin Einbau bedingt durch Translation der endogenen mRNA wurde subtrahiert.

RNA	Gesamteinbau an ^3H -Leucin (cpm)	cpm in den	cpm in den Frak-
		Fraktionen 19 - 36 und 44 - 57*	tionen 19 - 36 und 44 - 57*
			Gesamteinbau an ^3H -Leucin (cpm)
9 S mRNA	233 888	195 221	83,5 %
9 S mRNA + 28 S rRNA	931 448	759 508	81,5 %
28 S rRNA	219 584	20 958	9,5 %

*Die Werte sind korrigiert, da unter den angewandten

Fortsetzung des Textes zu Tabelle II:

Bedingungen 40 % der aufgetragenen Globinketten an den Carboxymethylcellulose-Säulen (CM 52, Whatman) adsorbiert werden (Knöchel et al.²³).

4.7. Untersuchung der Degradation von ^{125}J Globin mRNA in zellfreien Systemen

4.7.1. Aszites-System

Bei diesen Versuchen wurde ^{125}J markierte Globin mRNA in Abwesenheit und Gegenwart verschiedener Mengen an 28 S und 5 S rRNA im Aszites-System inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten (0, 5, 10, 30 und 60 Minuten) wurde die Radioaktivität TCA-fällbarer Polynucleotide gemessen. Abb. 10 zeigt, daß nach 60 Minuten nur noch 25 % der eingesetzten ^{125}J markierten mRNA durch TCA fällbar sind. Daß diese Abnahme auf einen Abbau durch RNAasen des Aszites-Systems zurückzuführen ist, zeigt die Kontrolle, bei der die mRNA in H_2O inkubiert wurde, wobei kein Abbau zu beobachten war. Andererseits kann durch Zugabe von 28 S rRNA in steigenden Mengen die Degradation gehemmt werden. Aus diesem Versuch geht hervor, daß das Aszites-System einen beträchtlichen Gehalt an RNAasen aufweist, deren Einwirkung auf Globin mRNA jedoch durch Zugabe von 28 S rRNA kompetitiv gehemmt wird. Analoge Versuche mit 18 S rRNA führten zu identischen Resultaten (hier nicht gezeigt). Demgegenüber bewirkt die Zugabe von 5 S rRNA nur eine geringfügige Hemmung der Degradierung von ^{125}J mRNA. Ein ähnliches Verhalten wies auch 4 S tRNA auf (hier nicht gezeigt).

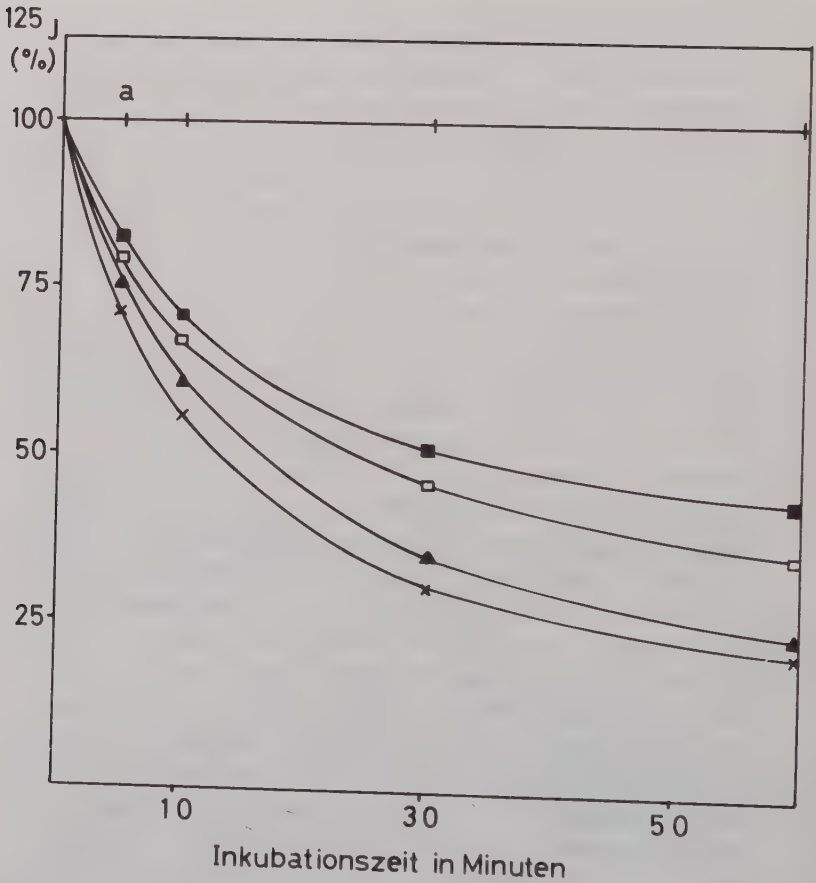


Abb. 10: Degradierung von ^{125}J markierter Globin mRNA im Aszites-System. Sechsfache Ansätze mit $6 \mu\text{g}$ 9 S mRNA (9 : 1 Mischung von mRNA : ^{125}J mRNA) wurden in Gegenwart von RWF bei 37°C inkubiert x-x-x. Als Kontrollversuch wurde ^{125}J markierte Globin mRNA bei 37°C in 0,01 M Tris (pH 7,5) inkubiert +--+-. $6 \mu\text{g}$ ^{125}J mRNA in Gegenwart von $12 \mu\text{g}$ 5 S rRNA ▲-▲-▲, $6 \mu\text{g}$ ^{125}J mRNA in Gegenwart von $12 \mu\text{g}$ 28 S rRNA □-□-□ und $6 \mu\text{g}$ ^{125}J mRNA in Gegenwart von $24 \mu\text{g}$ 28 S rRNA ■-■-■.

4.7.2. Weizenkeim-System

Der Versuch aus Kapitel 4.7.1. wurde unter Verwendung des Weizenkeim-Systems wiederholt (Abb. 11). Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten konnten noch 80 % der eingesetzten ^{125}J mRNA durch TCA gefällt werden. Der RNAase-Gehalt des Weizenkeim-Systems ist also sehr viel niedriger als der des Aszites-Systems. Die Inkubation von ^{125}J mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA führt auch hier zu einer leichten Reduzierung des Abbauprozesses, jedoch ist der Schutz infolge des geringeren RNAase-Gehaltes des Weizenkeim-Systems sehr viel weniger ausgeprägt.

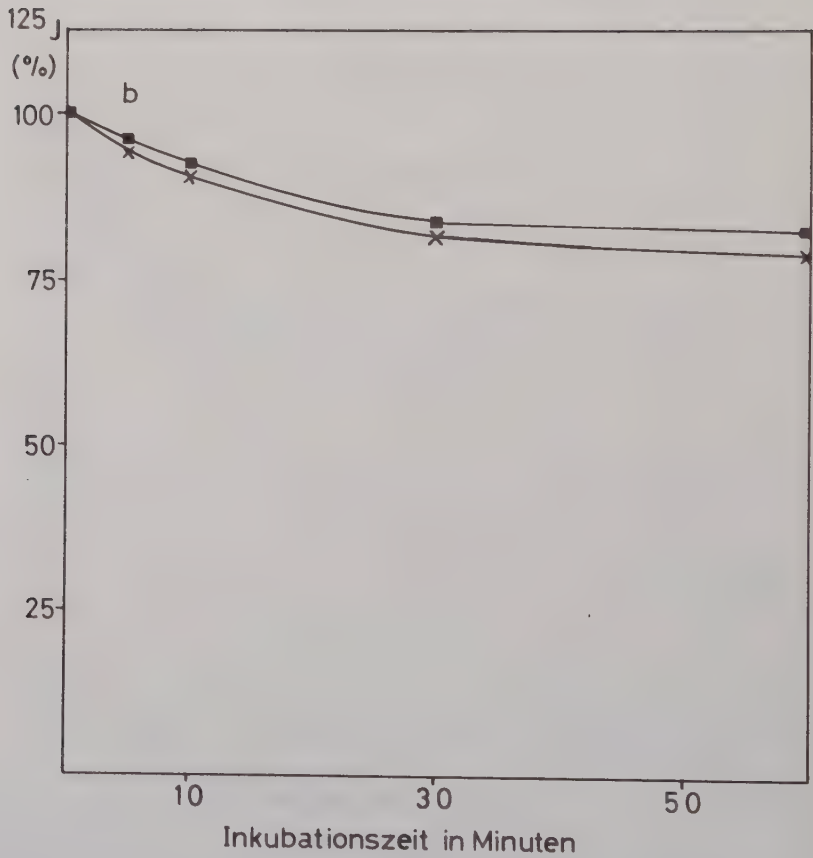


Abb. 11: Degradierung von ^{125}J markierter Globin mRNA im Weizenkeim-System. Sechsfache Ansätze mit $0,6 \mu\text{g } ^{125}\text{J}$ 9 S mRNA wurden in Abwesenheit x-x-x und Gegenwart von $1,2 \mu\text{g } 28 \text{ S rRNA}$ ■-■-■ bei 25°C inkubiert.

5. Diskussion

Globin mRNA aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern wurde in zellfreien Proteinbiosynthese-Systemen aus Ehrlich Aszites-Tumorzellen und Weizenkeimen translatiert. Die Zugabe ribosomaler Waschfaktoren aus Polyisomen von Hühnererythroblasten bewirkte im Aszites-System in Übereinstimmung mit früheren Berichten (Mathews et al.²⁹, Metafora et al.³⁰, Lebleu et al.³¹) eine Stimulierung, im Weizenkeim-System dagegen eine Hemmung der Proteinbiosynthese. Ob es sich bei den Experimenten mit dem Weizenkeim-System um eine spezifische Inhibition des tierischen Extraktes gegen das pflanzliche System oder um nicht optimale experimentelle Bedingungen (z.B. wurden die Ionenkonzentrationen nicht weiter variiert, und es wurden Chloridionen zugegeben) handelt, wurde nicht weiter untersucht.

Um herauszufinden, inwieweit die Translation der Globin mRNA durch 4 S tRNA oder 5 S, 18 S und 28 S rRNA beeinflusst wird, wurden diese RNA-Spezies bei der Translation der mRNA hinzugesetzt. In Kontrollversuchen wurde das Stimulationsverhalten der genannten RNA-Spezies in Abwesenheit von Globin mRNA auf die Proteinsynthese des Aszites- und des Weizenkeim-Systems untersucht.

Im Aszites-System stimulierte die Zugabe von 18 S und 28 S rRNA den ³H-Leucin Einbau. Ferner zeigte die Proteinsynthese durch Globin mRNA im Beisein dieser beiden RNA-Spezies eine weitere Steigerung. Dabei war die Stimulation höher als die Summe der durch mRNA und rRNA allein bewirkten ³H Einbauraten. 4 S tRNA und 5 S rRNA zeigen weder eine Stimulierung des Systems noch eine Erhöhung der Translationsrate der mRNA. Für die 5 S rRNA konnte im Gegenteil ein geringer Inhibitions-

effekt auf die mRNA-Translation beobachtet werden. Im Weizenkeim-System war dagegen keine Stimulierung der Proteinbiosynthese auf Zugabe von 4 S, 5 S, 18 S und 28 S RNA zu beobachten. Auch der Stimulierungseffekt durch 18 S und 28 S rRNA auf die Translation von Globin mRNA blieb aus (im Fall der 5 S rRNA konnte ebenfalls eine geringfügige Inhibition festgestellt werden). Für das Aszites-System waren die publizierten Ergebnisse über die Abhängigkeit der Stimulation von 4 S tRNA widersprüchlich (Aviv et al.³², Metafora et al.³⁰, Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰, Mathews³³). Die Tatsache, daß in dieser Arbeit kein Effekt nachgewiesen werden konnte, entspricht einer bereits früher geäußerten Vermutung (Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰), wonach der Bedarf des Systems an 4 S tRNA von der Art der Präparation abhängt. Für den Fall, daß der postmitochondriale Überstand einer Dialyse ausgesetzt wurde, zeigte sich eine tRNA Abhängigkeit, nicht jedoch bei Verwendung einer Sephadex Gelfiltration, der in dieser Arbeit benutzten Methode. Die Stimulierung des Aszites-Systems durch 18 S und 28 S rRNA könnte durch eine Kontamination dieser rRNA-Spezies mit mRNA verursacht werden. Eine Aggregation von Globin mRNA an 18 S und 28 S rRNA war in der Literatur erwähnt worden (Kabat⁹). Jedoch wurden diese RNAs in der vorliegenden Arbeit durch Gradienten-Zentrifugation in einem denaturierenden Lösungsmittel unter Elimination poly(A)-haltiger RNA-Spezies durch Chromatographie an oligo(dT)-Cellulose gereinigt. Bemerkenswert ist, daß es für die Stimulierung keine Rolle spielt, ob die rRNA aus Hühnererythroblasten (hoher Globin mRNA Gehalt, wenig andere mRNA-Spezies im Bereich von 18 S und 28 S) oder aus elf Tage alten Hühnerembryorümpfen (geringer Globin mRNA Gehalt, ent-

sprechend höherer Gehalt an anderen mRNA-Spezies im Bereich von 18 S und 28 S) isoliert wurde. Als entscheidendes Kriterium gegen eine Kontamination mit mRNA sprach die Tatsache, daß weder 18 S noch 28 S rRNA im Weizenkeim-System eine Stimulierung bewirkten. Deshalb wurde eine andere Erklärung in Betracht gezogen. Der ^3H -Leucin Einbau im Aszites-System ohne Zugabe von mRNA beruht auf einer Translation von endogener mRNA. Die Zugabe von 18 S und 28 S rRNA könnte dann einen Schutz dieser endogenen mRNA gegenüber einem Abbau durch RNAasen bewirken. Diese Vermutung konnte durch Translation von Globin mRNA und 28 S rRNA in Aszites-Systemen mit verlängerter Vorinkubationszeit bestätigt werden (Tabelle I, Spalte 2 - 5, Seite 40). Die absoluten Einbauraten waren durch Zerstörung von Translationsfaktoren geringer. Während jedoch die Stimulationsrate in % des endogenen Einbaues bei Zugabe von Globin mRNA gering anstieg, wurde im Falle der 28 S rRNA eine Abnahme von 41 % auf 27 % beobachtet. Dieses Ergebnis kann durch eine Degradierung der endogenen mRNA während der Vorinkubationszeit erklärt werden. Der andere im Aszites-System zu beobachtende Effekt, nämlich die Steigerung der Translationsrate von Globin mRNA bei Gegenwart von 18 S und 28 S rRNA, findet ebenfalls durch den Schutz gegenüber Nucleasen seine Erklärung. Dafür spricht auch, daß die Steigerung bei geringen mRNA Konzentrationen stärker ist als bei hohen, wobei im letzteren Fall die größere Menge mRNA sich sozusagen selbst schützen könnte und der Steigerungseffekt geringer wird. Es konnte jedoch nicht geklärt werden, warum dieser Schutzeffekt bei längerer Vorinkubationszeiten abnimmt (Tabelle I, Spalte 7, Seite 40). Unter anderem wäre denkbar, daß das System durch die Vorinkubation so weitgehend an Faktoren verarmt, daß diese

Faktoren begrenzend werden. Ferner ist eine Aktivierung rRNA spezifischer Nucleasen in Betracht zu ziehen. Um zu sehen, inwieweit die ribosomale Waschfraktion die Ergebnisse beeinflusst, wurde 9 S mRNA, 9 S mRNA und 28 S rRNA sowie 28 S rRNA im Aszites-System in Abwesenheit von RWF translatiert. Obwohl die absoluten Einbau-raten niedriger waren, konnten beide Effekte, nämlich Stimulation durch 28 S rRNA und Steigerung der Stimulationsrate von mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA, auch bei diesem Experiment beobachtet werden. Dieses Ergebnis macht eine Beteiligung der RWF an diesen Effekten unwahrscheinlich.

Es war weiterhin zu klären, ob die Steigerung der Translationsrate von mRNA in Gegenwart von rRNA tatsächlich auf Synthese von Globinketten zurückzuführen ist. Mittels Produktanalyse auf Globinketten durch Sephadex G 100 und Carboxymethylcellulose-Chromatographie konnte nachgewiesen werden, daß in den Ansätzen mit 9 S mRNA sowie 9 S mRNA in Gegenwart von 28 S rRNA mehr als 80 % der neusynthetisierten Proteine Globinketten darstellen. Das beweist, daß die Steigerung in Gegenwart von 28 S rRNA tatsächlich einer Globinkettensynthese entspricht. Wenn die Theorie zutrifft, daß 18 S und 28 S rRNA im Aszites-System in stärkerem Maße als im Weizenkeim-System einen Schutzeffekt gegenüber RNAasen aufweisen, muß sich dieser Effekt an Hand des Abbaus von mRNA in beiden Systemen direkt nachweisen lassen. Zu diesem Zweck wurde die Degradierung von ^{125}J markierter mRNA im Aszites- und Weizenkeim-System durch Präzipitation mit TCA nach unterschiedlichen Inkubationszeiten gemessen. Während im Aszites-System nach einer Inkubation

von 60 Minuten nur noch 25 % der zugefügten markierten RNA durch TCA fällbar war, betrug dieser Wert im Weizenkeim-System immerhin noch 80 %. An dieser Stelle sei jedoch betont, daß die tatsächliche Degradierung der mRNA stärker sein dürfte. Ein Bruch oder wenige Brüche im mRNA-Strang machen die vollständige Translation unmöglich, jedoch sind die Fragmente noch durch TCA fällbar. Ein bemerkenswertes Resultat bei diesen Experimenten war die Feststellung, daß die Degradation der mRNA bei Gegenwart von 28 S rRNA im Aszites-System signifikant gehemmt war. Im Weizenkeim-System war die Degradation von mRNA dagegen nur in sehr geringem Maße gehemmt. Dies ist um so verständlicher, als hier ja auch in Abwesenheit von 28 S rRNA nur eine geringe Degradierung zu beobachten war. Darüber hinaus zeigte die 5 S rRNA im Aszites-System nur eine geringfügige Reduzierung des Abbaus der mRNA. 18 S rRNA verhielt sich ähnlich wie 28 S rRNA und 4 S tRNA wie 5 S rRNA. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß nur 18 S und 28 S rRNA im Aszites-System die Translation von mRNA erhöhen, wohingegen 4 S tRNA und 5 S rRNA keine Wirkung zeigen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse sprechen dagegen, daß die bereits früher beschriebene stimulierende Wirkung von 18 S und 28 S rRNA auf die Translation von mRNA (Kabat⁹, Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰) ein allgemeiner Effekt ist. Vielmehr deuten die Resultate darauf hin, daß die RNAase-Aktivität der verwendeten zellfreien Systeme hierbei von entscheidender Bedeutung ist. Deshalb ist es naheliegend, die Steigerung der Proteinsyntheserate in Gegenwart von 18 S und 28 S rRNA einem Schutz der mRNA gegen RNAasen zuzuschreiben. Insofern bestätigen die Ergebnisse frühere

Befunde von Jacobs-Lorena und Baglioni¹⁰, die ebenfalls eine Schutzfunktion von 18 S rRNA gegenüber einem RNAase Abbau von Globin - und Histon mRNA im Aszites-System postulierten. In vorliegender Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß der 28 S rRNA eine analoge Funktion zukommt, wohingegen die 5 S rRNA keine Wirkung zeigt. Das bedeutet, daß es sich um spezifische RNAasen handeln muß, welche bestimmte Sequenzen erkennen, die sowohl in der mRNA als auch in der 18 S und 28 S rRNA vorhanden sein müssen. Andererseits kann der Größe oder der Tertiärstruktur der RNA für diesen Schutzeffekt eine Bedeutung zukommen. Die von Kabat⁹ geäußerte Vermutung, daß Globin 9 S mRNA durch spezifische resersible Basenpaarung mit 18 S rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit aktiviert wird, ist weniger wahrscheinlich, da der Stimulationseffekt im Aszites-System auch mit 28 S rRNA zu beobachten ist. Im Weizenkeim-System kann dagegen weder mit 18 S noch mit 28 S rRNA eine Erhöhung der Translation der mRNA erreicht werden. Dieser Befund spricht gegen eine spezifische Stimulation der Initiation, steht aber andererseits mit dem oben postulierten Schutz vor RNAasen - wegen des geringen RNAase-Gehaltes dieses Systems - in Einklang.

Es ist jedoch denkbar - über kurzstreckige Sequenzkomplementaritäten zwischen mRNA und 18 S rRNA wurde berichtet (Shine und Dalgarno³⁴) -, daß der Schutz gegenüber RNAasen auf Basenpaarbildung zwischen mRNA und 18 S bzw. 28 S rRNA zurückzuführen ist, weil dann die Moleküle im Doppelstrangbereich der Nucleaseaktivität nicht zugänglich sind. Dieser Mechanismus hätte einen absoluten Schutz zur Folge, wir beobachten aber nur eine Minderung der Aktivität der RNAase, und dies läßt sich, wie oben

beschrieben, besser durch eine Substratkompetition
durch 18 S und 28 S erklären.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde Globin 9 S mRNA aus unreifen roten Blutzellen von Hühnern isoliert. Diese RNA wurde in zellfreien Proteinbiosynthese-Systemen aus Ehrlich Aszites-Tumorzellen im Beisein einer ribosomalen Waschfraktion sowie aus Weizenkeimen translatiert. Der Einfluß von 4 S tRNA, 5 S, 18 S und 28 S rRNA auf die Translation der mRNA wird untersucht. Die zellfreie Synthese von Globinketten durch Globin mRNA im Ehrlich Aszites-System kann durch Zugabe von 18 S und 28 S rRNA weiter stimuliert werden, nicht aber durch 4 S tRNA und 5 S rRNA. Durch Kontrollexperimente konnte gezeigt werden, daß die ribosomale Waschfraktion für diese Effekte nicht verantwortlich ist. Im Weizenkeim-System konnte durch keine der genannten RNA-Spezies eine weitere Stimulierung der Translation von Globin mRNA beobachtet werden. Nach Inkubation von ^{125}J markierter Globin mRNA in beiden Systemen wurde nach 60 Minuten eine Abnahme von 75 % der TCA-fällbaren Polynucleotide im Aszites-System gegenüber einer nur 20 %igen Abnahme im Weizenkeim-System gemessen. Der RNAase Abbau der mRNA im Aszites-System konnte jedoch durch Zugabe von 18 S und 28 S rRNA, hingegen nicht durch 5 S rRNA und 4 S tRNA verringert werden. Daraus folgt, daß der stimulierende Effekt von 18 S und 28 S rRNA auf die Translation von mRNA im zellfreien System aus Ehrlich Aszites-Tumorzellen im Gegensatz zum Weizenkeim-System darauf zurückzuführen ist, daß das Aszites-System eine höhere RNAase Aktivität aufweist und die Zugabe von 18 S und 28 S rRNA mit einem Schutz der mRNA gegenüber dem RNAase Abbau verbunden ist.

7. Literaturverzeichnis

1. Ross, J.
 (1976) J. Mol. Biol. 106, 403 - 420.
2. Curtis, P.J. und Weissmann, C.
 (1976) J. Mol. Biol. 106, 1061 - 1075.
3. Kwan, S.P., Wood, T.G. und Lingrel, J.B.
 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 74, 178 - 182.
4. Bastos, R.N. und Aviv, H.
 (1977) Cell 11, 641 - 650.
5. Knöchel, W. und Grundmann, U.
 (1977) Biochim. Biophys. Acta, im Druck.
6. Mathews, M.B.
 (1973) Essays Biochem. 9, 59 - 102.
7. Schutz, G., Beato, M. und Feigelson, P.
 (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 1218 - 1221.
8. Sippel, A.E., Feigelson, p. und Roy, A.K.
 (1975) Biochemistry 14, 825 - 829.
9. Kabat, D.
 (1975) J. Biol. Chem. 250, 6085 - 6092.
10. Jacobs-Lorena, M. und Baglioni, C.
 (1972) Biochemistry 11, 4970 - 4974.
11. Shine, J. und Dalgarno, L.
 (1975) Nature 254, 34 - 38.
12. Knöchel, W., Hendrick, D., Schröter, S. und Tiedemann, H.
 (1973) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 1389 - 1394.
13. Schall, H. und Turba, F.
 (1963) Biochem. Zeitschr. 339, 219 - 223.
14. Aviv, H. und Leder, P.
 (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1408 - 1412.
15. Suzuki, Y., Gage, L.P. und Brown, D.D.

- (1972) J. Mol. Biol. 70, 637 - 649.
16. Knöchel, W.
(1974) Mol. Biol. Rep. 1, 311 - 320.
 17. Heywood, S.M.
(1969) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
34, 799 - 803.
 18. Mathews, M.B. und Korner, A.
(1970) Eur. J. Biochem. 17, 328 - 338.
 19. Roberts, B.E. und Paterson, B.M.
(1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 70, 2330 - 2334.
 20. Neufang, O. und Tiedemann, H.
(1975) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.
356, 1445 - 1450.
 21. Hendrick, D., Knöchel, W., Schwarz, W., Pitzel, S.
und Tiedemann, H.
(1974) Develop. Biol. 36, 299 - 310.
 22. Schröter, S.
(1976) Dissertation, Freie Universität Berlin.
 23. Knöchel, W., Lange, D. und Hendrick, D.
(1976) Mol. Biol. Rep. 3, 143 - 150.
 24. Jacobs-Lorena, M., Baglioni, C. und Borun, T.W.
(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 2095 - 2099.
 25. Bloemendal, H.
(1972) "Mammalian messenger RNA" in "The Mechanism
of Protein Synthesis and its Regulation" Frontiers
of Biology, 27, North Holland Publishing Co,
Amsterdam-London.
 26. Mathews, M.B., Osborn, M. und Lingrel, J.B.
(1971) Nat. New Biol. 233, 206 - 209.
 27. Benveniste, K., Wilczek, J. und Stern, R.
(1974) Fed. Proc. 33, 1541, Abstr. No. 1794.
 28. Boedtker, H., Crkvenjakov, R.B., Last, J.A. und

- Doty, P.
(1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 4208 - 4212.
29. Mathews, M.B., Pragnell, I.B., Osborn, M. und Arnstein, H.R.V.
(1972) Biochim. Biophys. Acta 287, 113 - 123.
30. Metafora, S., Terada, M., Dow, L.W., Marks, P.A. und Bank, A.
(1972) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 69, 1299 - 1303.
31. Lebleu, B., Nudel, U., Falcoff, E., Prives, C. und Revel, M.
(1972) FEBS Lett. 25, 97 - 103.
32. Aviv, H., Boime, I. und Leder, P.
(1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 2303 - 2307.
33. Mathews, M.B.
(1972) Biochim. Biophys. Acta 272, 108 - 118.
34. Shine, J. und Dalgarno, L.
(1974) Biochem. J. 141, 609 - 615.

Lebenslauf

Am 28. Oktober 1950 wurde ich, Christian Finke, als Sohn des damaligen Studienrates Dr. phil. Hans Finke und seiner Ehefrau Margarete, geb. Scholl, in Salzgitter-Lebenstedt geboren und daselbst ev.-luth. getauft.

Meine Eltern zogen 1954 nach Braunschweig-Lehndorf. Dort ging ich ab 1957 zur Grundschule. Von 1961 bis 1969 besuchte ich das Gauß-Gymnasium in Braunschweig und legte dort 1969 die Reifeprüfung ab.

Ab Wintersemester 1969/70 studierte ich Zahnmedizin an der Freien Universität Berlin, wo ich 1975 das Staatsexamen ablegte. Seit Juni 1975 bin ich als wissenschaftlicher Assistent in der chirurgischen Abteilung der Zahnklinik der Freien Universität Berlin tätig.

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. H. Tiedemann und Priv. Doz. Dr. Dr. W. Knöchel am Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

Grossen Dank schulde ich Herrn Prof. Dr. Dr. Tiedemann für die Überlassung dieses Themas und die zur Verfügung gestellten Mittel. Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. W. Knöchel danke ich für seine grosse Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich Embryonale Entwicklung und Differenzierung) danke ich für finanzielle Unterstützung.

